

วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

41

สมชาย จงวุฒิเวศย์

บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษยชาติตั้งแต่ยุคก่อนประวัติศาสตร์หรือเมื่อมนุษย์มีการเปลี่ยนแปลงวิถีการดำรงชีพจากการล่าสัตว์มาเป็นเกษตรกรรมเมื่อประมาณ 6,000-8,000 ปีก่อน¹ สำหรับบันทึกเกี่ยวกับโรคมาลาเรียพบได้ในตำราที่เป็นต้นตำรับของการแพทย์จีนเมื่อประมาณ 2,700 ปีก่อนคริสตกาล โดยได้กล่าวถึงลักษณะของไข้แบบต่างๆ ที่เกิดขึ้นร่วมกับภาวะม้ามโตซึ่งเข้าได้กับโรคมาลาเรีย² นอกจากนี้หลักฐานทางอารยธรรมของจีนแล้วบันทึกเกี่ยวกับมาลาเรียในโลกตะวันออกมีปรากฏในตำราแพทย์ของอินเดียในอารยธรรมของอินโดอารยันเมื่อประมาณ 2,000 ปีก่อนคริสตกาลโดยตำราอายุรเวท (Ayurveda) ในสมัยพุทธกาล ได้กล่าวถึงอาการไข้ที่พบร่วมกับอาการม้ามโตและถือว่าเป็นราชาแห่งโรคทั้งปวง (king of diseases) รวมทั้งมีการบรรยายถึงลักษณะไข้วันเว้นวันและวันเว้นสองวัน³ ในยุคกรีกโบราณเมื่อราว 1,600 ปีก่อนคริสตกาลมีบันทึกเกี่ยวกับการรุกรานระหว่างกลุ่มชนในยุโรปตอนล่างกับเอเชียตะวันออกไกล⁴ รวมทั้งแถบประเทศอียิปต์โบราณได้บรรยายลักษณะของโรคที่มีอาการไข้ หนาวสั่นและม้ามโต ในบันทึกบนกระดาษปาปิรุสของเอ็บเบอรัส (Ebers Papyrus)⁵ การกล่าวถึงโรคมาลาเรียในบันทึกโรคระบาดของฮิปโปเครติส (Hippocrates' Epidemics) เมื่อราว 400 ปีก่อนคริสตกาลได้บรรยายถึงอาการไข้วันเว้นวัน (tertian fever) และไข้วันเว้นสองวัน (quartan fever) โดยอาการไข้แบบนี้มีอันตรายน้อยที่สุด⁶ นอกจากนี้โรคมาลาเรียยังมีความสำคัญ

ในประวัติศาสตร์และการเมืองของโลกหลายครั้ง เช่น โรคมาลาเรียอาจเป็นสาเหตุการสวรรคตของพระเจ้าอเล็กซานเดอร์มหาราชแห่งเมสซิโดเนีย (Alexander the Great of Macedonia)⁷ เมื่อประมาณ 340 ปีก่อนคริสตกาล โรคมาลาเรียยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการล่มสลายของจักรวรรดิโรมัน ในสมัยสงครามครูเสด (Crusades) ซึ่งเป็นการรุกรานของกองทัพคริสตจักรและชาวยุโรปเพื่อแย่งชิงดินแดนอันศักดิ์สิทธิ์ (Holy Land) ที่อยู่ภายใต้การปกครองของชาวมุสลิม ในช่วงคริสตศตวรรษที่ 11-13 แม้ว่าการสู้รบได้ดำเนินเป็นเวลานานหลายครั้ง แต่บ่อยครั้งที่กองทัพคริสตจักรต้องล่าถอยทัพเพราะปัญหาโรคมาลาเรียที่ปรากฏในดินแดนอันศักดิ์สิทธิ์ดังกล่าว เป็นต้น⁷ แม้ว่าสาเหตุของโรคมาลาเรียได้ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1880 โดยนายแพทย์ ชาลส์ หลุยส์ อัลฟอนส์ ลาเวอแรน (Charles Louis Alphonse Laveran)⁸ รวมทั้งองค์ความรู้ที่ได้รับการสั่งสมมาอย่างต่อเนื่องโดยแพทย์และนักวิทยาศาสตร์จากทั่วโลกโดยมุ่งหวังที่จะควบคุมหรือกำจัดโรคมาลาเรียซึ่งประสบผลสำเร็จในหลายพื้นที่ในยุโรปในอดีต อย่างไรก็ตามแม้ว่าโรคมาลาเรียสามารถรักษาและควบคุมได้ด้วยยาต้านมาลาเรียร่วมกับการควบคุมยุงพาหะ แต่การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาต้านมาลาเรียและยุงก้นปล่องพาหะเกิดการดื้อต่อยาฆ่าแมลงทำให้มาตรการดังกล่าวไม่อาจบรรลุผลได้ดี ดังนั้นมาตรการอื่น เช่น การผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียจึงนับว่ามีความสำคัญเพื่อเสริมมาตรการควบคุมโรคโดยวิธีอื่น ๆ

โรคมาลาเรีย

เชื้อก่อโรค

เชื้อมาลาเรียจัดอยู่ใน genus *Plasmodium* ประกอบด้วย species ต่างๆ ประมาณ 120 species แต่ชนิดที่พบและทำให้เกิดโรคในคนมี 5 ชนิดได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* และ *Plasmodium knowlesi*

ระบาดวิทยา

องค์การอนามัยโลกรายงานผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลก ในปี ค.ศ. 2009 จำนวน 225 ล้านคน และในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิตประมาณ 781,000 คน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผู้ที่อาศัยในทวีปแอฟริกา⁹ สำหรับในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบผู้ป่วยราวร้อยละ 10 ของผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลก และมีผู้เสียชีวิตจากโรคมาลาเรียคิดเป็นร้อยละ 5 ของจำนวนผู้เสียชีวิตทั่วโลก¹⁰ สำหรับอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียในประเทศไทยพบว่าลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 4 ทศวรรษที่ผ่านมา โดย *P.falciparum* ลดลงจากเดิมถึง 35 เท่า ส่วน *P.vivax* ลดลงเพียง 7 เท่า ทำให้สัดส่วน *P.falciparum* ต่อ *P.vivax* ลดลงจาก 4.1 ในปี ค.ศ. 1965 เป็น 0.8 ในปี ค.ศ. 2002¹¹ ในปี ค.ศ. 1998 พบผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียเฉพาะที่เป็นชาวไทยจำนวน 131,055 ราย ส่วนในปี ค.ศ. 2008 จำนวนผู้ติดเชื้อลดลงเหลือ 25,449 ราย¹⁰ ในประเทศไทยมีแพร่กระจายของโรคมาลาเรียตลอดทั้งปี แต่จะพบผู้ติดเชื้อจำนวนมากในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึง กรกฎาคม และช่วงเดือนตุลาคม ถึง พฤศจิกายน โดยพบเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิดในประเทศไทย^{12,13} อัตราการติดเชื้อมากกว่า 1 species พบได้มากตามชายแดนไทยและพม่าซึ่งในบางพื้นที่อาจพบได้มากถึงร้อยละ 24¹³

วงชีวิตของเชื้อ

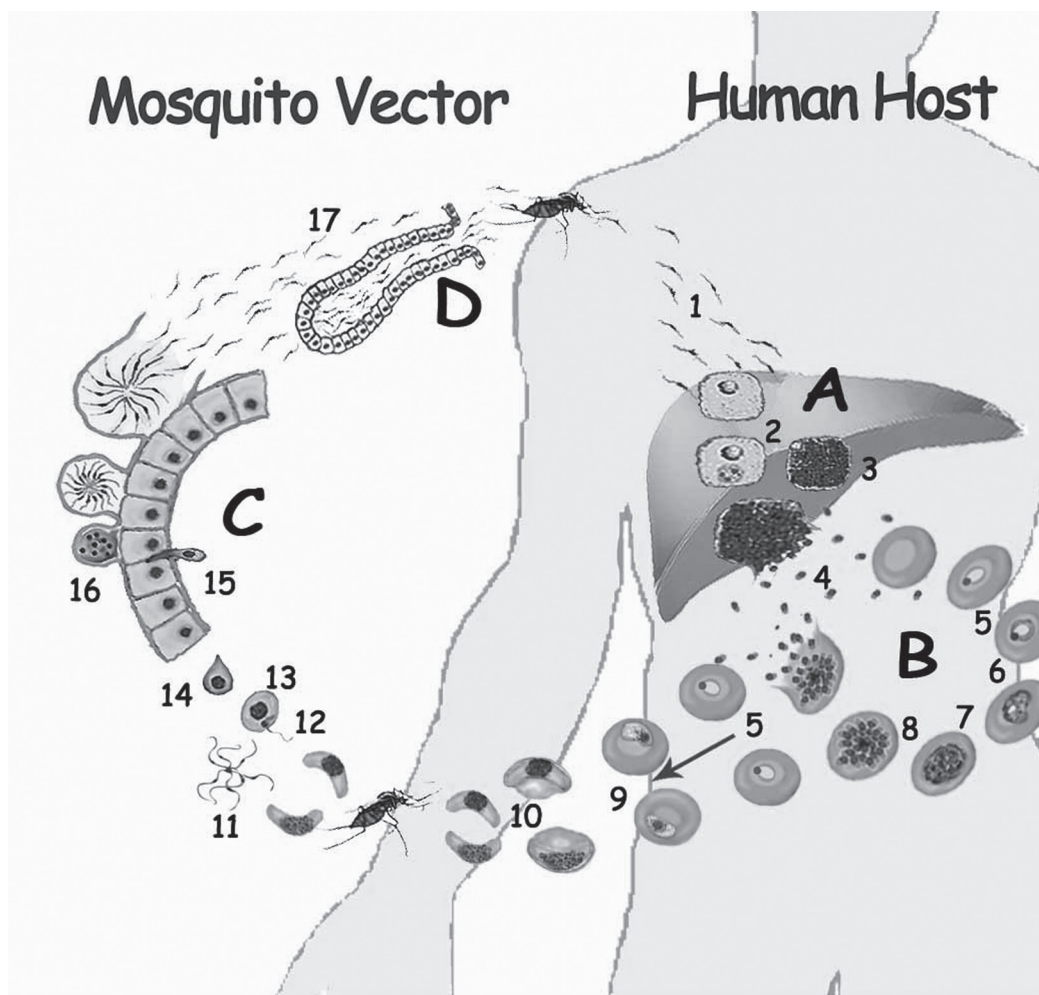
เชื้อมาลาเรียมีวงชีวิตที่ต้องอาศัยสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังคือยุงก้นปล่องเพื่อการเจริญแบบใช้เพศ (sexual development) ดังนั้นยุงก้นปล่องจึงเป็นโฮสต์จำเพาะหรือโฮสต์เฉพาะ (definitive host) สำหรับเชื้อมาลาเรีย ในขณะที่การเจริญของเชื้อมาลาเรียในคนเป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ (asexual development) ดังนั้นคนจึงเป็นโฮสต์ตัวกลางหรือโฮสต์กึ่งกลาง (intermediate host)⁹

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียมีการเจริญเป็นระยะต่างๆ หลายระยะและมีความซับซ้อน (รูปที่ 1) ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ช่วงของการเจริญได้แก่

1. การเจริญของเชื้อมาลาเรียเพื่อการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ
2. การมีระยะที่สามารถแพร่กระจายหรือลูกกลมเข้าสู่เซลล์ ได้แก่ ระยะโอโอไคไนต์ (ookinete) ระยะเมอร์โรซอइट (merozoite) และระยะสปอร์โรซอइट (sporozoite) ซึ่งมีเอปิคอล ออร์แกเนลล์ (apical organelle) เพื่อการดังกล่าว
3. การสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยเริ่มตั้งแต่การสร้างระยะแกมมีโตไซต์ (gametocyte) ที่อยู่ในคนจนพัฒนาถึงระยะ ookinete ในยุงก้นปล่อง

สำหรับการเจริญของเชื้อมาลาเรียเพื่อการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศประกอบด้วย

1. การเจริญของโอโอซิสต์ (oocyst) ในยุงก้นปล่องและเรียกกระบวนการดังกล่าวว่า sporogony
2. การเจริญของเชื้อระยะที่อยู่ในตับเรียกว่า tissue schizogony หรือ exo-erythrocytic schizogony หรือ pre-erythrocytic schizogony
3. การเจริญในเม็ดเลือดแดงเรียกว่า erythrocytic schizogony¹⁴ การเจริญแบบใช้เพศของเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นเมื่อยุงก้นปล่องดูดเลือดคนที่มียาระยะ gametocytes เข้าไปในกระเพาะอาหาร gametocyte เพศเมีย จะเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (female gamete) ส่วน gametocyte เพศผู้ จะเกิดกระบวนการที่เรียกว่า



รูปที่ 1 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ประกอบด้วย การเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศในเซลล์ตับ [A] และในเม็ดเลือดแดงของคน [B] เมื่อยุงกัดคนเชื้อมาลาเรียจะเจริญในกระเพาะอาหาร [C] และในต่อมน้ำลาย [D] เพื่อเป็นระยะติดต่อสู่คนต่อไป
 ระยะในการเจริญได้แก่ (1) sporozoite (2) hepatic trophozoite (3) hepatic schizont with merozoites (4) free merozoite (5) ring stage (6) growing trophozoite (7) growing schizont (8) mature schizont with merozoites (9) immature gametocytes (10) mature gametocytes (11) exflagellation of male gametocyte (12) male gamete (13) female gamete (14) zygote (15) ookinete (16) oocyst (17) salivary gland sporozoite (รูปโดย สมชาย จงวุฒิเวศย์ และ อุรัสยา พัฒนวงศ์)

exflagellation ทำให้เกิดเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gamete) จำนวน 8 ตัวที่มีแฟลกเจลลา การเจริญดังกล่าวใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เกิดการปฏิสนธิกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเจริญเป็นไซโกต (zygote) ซึ่งยังคงอยู่ในช่องว่างของกระเพาะอาหารยุง เมื่อไซโกตมีการยื่นเท้าเทียมเพื่อเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุงเรียกระยะนี้ว่า ookinete แล้วเจริญอยู่ที่ผนังด้านนอกของกระเพาะอาหาร โดยมีเยื่อบุกระเพาะอาหารด้านนอกปกคลุมอยู่เรียกระยะดังกล่าวว่า oocyst เมื่อมีการเจริญต่อไปภายในจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน

เกิดเป็น sporozoite โดยใน 1 oocyst มีจำนวน sporozoite ประมาณ 1 ถึง 2 พันตัว¹⁵ ยุงหนึ่งตัวอาจมี oocyst อยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อ sporozoite เจริญเต็มที่จะแตกออกจาก oocyst แล้วกระจายไปตามช่องว่างในทรวงอกและเคลื่อนที่ไปสู่ต่อมน้ำลายของยุงและสะสมอยู่ในน้ำลายเป็นจำนวนมากระยะนี้ยุงที่มี sporozoite ในต่อมน้ำลายสามารถแพร่เชื้อมาลาเรีย โดย sporozoite ซึ่งปะปนมากับน้ำลายยุงขณะกัดคน ระยะเวลาที่เชื้อมาลาเรียเจริญในยุงแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสภาวะแวดล้อม กล่าวคือถ้าอุณหภูมิสูงจะเจริญเร็วกว่าอุณหภูมิต่ำ แต่ทั้งนี้ต้องอยู่

ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังขึ้นกับชนิดของ เชื้อมาลาเรียและชนิดของยุงด้วย ระยะเวลาที่เจริญในยุง ประมาณ 8 ถึง 35 วัน¹⁴

เมื่อยุงที่มีเชื้อมาลาเรียกัดคนจะปล่อยระยะ sporozoite เข้าสู่ร่างกายหลังจากนั้นจะเข้าสู่เซลล์ตับแล้ว จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะในการเจริญเติบโต และมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น เรียกระยะที่อยู่ในเซลล์ตับ ว่า hepatic stage หรือ exoerythrocytic stage ระยะ นี้จะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งภายในไซโตพลาสซึม อันเดียวกัน ทำให้ระยะนี้มีหลายนิวเคลียสในเซลล์เดียว เรียกว่าไซซอนต์ (schizont) จนในที่สุดเมื่อมี การแบ่ง ไซโตพลาสซึมทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียวเรียกว่า merozoite เรียกกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ นี้ว่า schizogony มาลาเรียต่างชนิดกันจะมีจำนวน merozoite แตกต่างกัน กล่าวคือ *P.falciparum* จะมีจำนวน merozoite ประมาณ 30,000 ถึง 40,000 ตัวต่อ sporozoite 1 ตัว ในขณะที่ *P.ovale* และ *P.malariae* จะมี merozoite ประมาณ 15,000 ตัว ส่วน *P.vivax* จะมีประมาณ 10,000 ตัวต่อ sporozoite 1 ตัว สำหรับ *P.knowlesi* ยังไม่มีข้อมูล ชัดเจนแต่คาดว่าน่าจะใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ระยะเวลาที่ sporozoite เจริญจนเกิดเป็น merozoite ในตับก็แตกต่างกัน ไปตามชนิดของมาลาเรีย¹⁴

ระยะ sporozoite ของ *P.falciparum*, *P.malariae* และ *P.knowlesi* เมื่อเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะมีการเจริญเติบโตต่อไปทั้งหมด แต่สำหรับ *P.vivax* และ *P.ovale* นั้นส่วนหนึ่งจะเปลี่ยนแปลงและเจริญต่อไปเช่นเดียวกับ *P.falciparum*, *P.malariae* และ *P.knowlesi* แต่จะมีบางส่วนที่เข้าสู่เซลล์ตับแล้วหยุดพักการเจริญเติบโตชั่วคราว แล้วจึงกลับมาเจริญต่อไปอีก ซึ่งจะใช้เวลาแตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์และชนิดของมาลาเรียโดยอาจยาวนาน เพียงไม่กี่เดือนหรืออาจจะนานเป็นปีก็ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดไขกลับ (relapse) ในผู้ป่วยเรียกระยะที่มาลาเรีย หยุดพักการเจริญในเซลล์ตับชั่วคราวว่า ฮิปโนซอยด์ (hypnozoite)^{16,17} เมื่อ merozoite แยกออกจากเซลล์ตับ จะออกมาเป็นอิสระนอกเซลล์ในกระแสเลือดชั่วคราว หลังจากนั้น merozoite จะลุกลามเข้าไปในเม็ดเลือดแดงภายใน

ระยะเวลาประมาณ 1 ถึง 2 นาทีเท่านั้น¹⁴ ภายหลังจาก merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงแล้วจะมีการเจริญต่อไป โดยมี vacuole ขนาดใหญ่อยู่ภายในเซลล์ทำให้นิวเคลียส ถูกดันไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ระยะนี้เมื่อย้อมเลือด ด้วยสี giemsa จะเห็นมาลาเรียมีรูปร่างคล้ายแหวน โดย ส่วนไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินและนิวเคลียสติดสีแดงเรียก ระยะนี้ว่าระยะวงแหวนหรือ ring stage (ring form หรือ young trophozoite) มาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงจะได้ อาหารจากการกินฮีโมโกลบิน โดยอาศัยกระบวนการพิน โนไซโตซิส (pinocytosis) เมื่อมาลาเรียมีการเจริญมากขึ้น ระยะวงแหวนจะเปลี่ยนเป็นระยะ growing trophozoite โดยมีไซโตพลาสซึมแผ่ขยายออกมีลักษณะเป็นเท้าเทียม เนื่องจากเชื้อมาลาเรียไม่สามารถย่อยฮีโมโกลบินได้อย่าง สมบูรณ์จึงเกิดจุดสีน้ำตาลปนดำ เรียกว่า malarial pigment หรือ hemozoin^{18,19} ให้เห็นภายในไซโตพลาสซึมของ มาลาเรีย นอกจากนี้ตั้งแต่การเจริญของระยะ growing trophozoite เป็นต้นไปนั้น ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงจะพบจุดสีชมพูเมื่อย้อมด้วยสี giemsa โดยมีรูปร่าง แตกต่างกันไปตามชนิดของมาลาเรีย สำหรับ *P.falciparum* จะเห็นเป็นจุดใหญ่ หรือเป็นแท่งสั้น ๆ เรียกว่า Maurer's cleft สำหรับ *P.vivax* และ *P.ovale* จะเห็นเป็นจุดเล็ก ๆ ขนาดเท่า ๆ กันกระจายทั่วไปเรียกว่า Schuffner's dot และ *P.malariae* จะเห็นเป็นจุดเล็กกระจายทั่วไป เรียกว่า Ziemann's dot ส่วน *P.knowlesi* จะมีรูปร่างไม่ แน่นนอน ขอบไม่ชัดเจน มีขนาดต่าง ๆ กันและมีจำนวนไม่ มากเรียกว่า Sinton and Mulligan's stippling¹⁴

โทรโฟซอยด์เมื่อเจริญต่อไปจะมีการแบ่งนิวเคลียส หลายครั้งภายในไซโตพลาสซึมเดิมทำให้เกิดระยะ schizont ซึ่งมีหลายนิวเคลียส เรียกกระบวนการนี้ว่า schizogony หลังจากนั้นเมื่อ schizont เจริญเต็มที่แล้วจะมีการแบ่ง ไซโตพลาสซึมทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียว เรียกระยะ ดังกล่าว ว่า schizont ระยะหลัง (late schizont) และเรียก แต่ละเซลล์ภายในว่า merozoite จำนวน merozoite ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันไปตามชนิดของมาลาเรีย โดย *P.falciparum* จะให้ merozoite มีจำนวนตั้งแต่ 8 ถึง 26 ตัว ส่วน *P.vivax* มีจำนวน 12 ถึง 24 ตัว สำหรับ *P.malariae* และ *P.ovale*

มีจำนวน merozoite ตั้งแต่ 6 ถึง 12 ตัว และ *P.knowlesi* มีจำนวน merozoite ตั้งแต่ 6 ถึง 16 ตัว¹⁴ ต่อมา merozoite จะออกจากเม็ดเลือดแดงโดยการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) และเป็นอิสระในกระแสเลือดชั่วคราวพร้อมที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ และมีการเจริญเป็นระยะต่าง ๆ ดังกล่าวต่อไป เรียกระยะที่มีการเจริญและเพิ่มจำนวนโดยไม่ใช้เพศภายในเม็ดเลือดแดงว่า asexual erythrocytic cycle ซึ่ง *P.knowlesi* ใช้เวลาน้อยที่สุดเพียง 24 ชั่วโมง *P.falciparum* ใช้เวลาประมาณ 36 ถึง 48 ชั่วโมง ส่วน *P.vivax* และ *P.ovale* ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง สำหรับ *P.malariae* ใช้เวลานานที่สุดคือ 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ช่วงที่ merozoite ออกจากเม็ดเลือดแดงนั้นจะมีการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงและมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการไข้หนาวสั่นในผู้ป่วย^{20,21}

ระยะที่มาลาเรียเจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดงแบบไม่ใช้เพศ (asexual erythrocytic cycle) นี้เมื่อเกิดขึ้นหลายรอบแล้ว merozoite ที่เกิดในรอบหลัง ๆ บางส่วนจะมีการเจริญต่อไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์เรียกว่า gametocyte ซึ่ง gametocyte ของ *P.falciparum* จะมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent form) หรือกล้วยหอมโดย gametocyte เพศผู้หรือ microgametocyte จะมีลักษณะอ้วนและสั้นกว่า gametocyte เพศเมียหรือ macrogametocyte ส่วน gametocyte ของ *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale* และ *P.knowlesi* มีรูปร่างกลมรีโดย macrogametocyte มีขนาดใหญ่กว่า microgametocyte เช่นเดียวกัน เมื่อ युกันปล่องดูดเลือดคนระยะ gametocyte จะเจริญต่อในกระเพาะอาหารของยูงต่อไป²²⁻²⁴

ยุงพาหะนำเชื้อ

ใช้มาลาเรียมียูกันปล่องเป็นพาหะนำโรค สำหรับในประเทศไทยมียูกันปล่องที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญสามารถจำแนกตามกลุ่มดังนี้²⁵

1. ยุงพาหะหลัก (primary vectors) มีบทบาทสูงในการแพร่เชื้อมาลาเรียในพื้นที่ป่าเขา สวนยาง และสวนผลไม้ ยูงในกลุ่มนี้ได้แก่

1.1 *Anopheles dirus* เป็นยูงที่มีประสิทธิภาพ

สูงสุดในการแพร่เชื้อมาลาเรียในประเทศไทยชอบเพาะพันธุ์ตามแหล่งน้ำขังที่มีร่มเงา มีนิสัยชอบกัดกินเลือดคนและเกาะพักนอกบ้าน ออกหากินเวลาตั้งแต่ 18.00-04.00 น.

1.2 *An.minimus* พบได้ทั่วไปในพื้นที่แถบเชิงเขา ชอบเพาะพันธุ์ตามแหล่งน้ำไหลและน้ำซับ ชอบกัดกินเลือดคนและเกาะพักในบ้าน จะออกหากินเวลาตั้งแต่ 18.00-22.00 น.

1.3 *An.maculatus* เป็นยุงพาหะสำคัญทางภาคใต้ของประเทศไทยและมาเลเซีย เพาะพันธุ์ในลำธารน้ำไหลที่แสงแดดส่องถึง มีนิสัยที่ชอบกัดกินเลือดสัตว์และคน ออกหากินเวลาตั้งแต่ 18.00-21.00 น.

2. ยุงพาหะรอง (secondary vectors) ได้แก่

2.1 *An.sundaicus* พบในพื้นที่ชายทะเลและเกาะแก่งต่างๆ ทางภาคตะวันออกและภาคใต้ เพาะพันธุ์ในน้ำกร่อยและชอบกัดคนนอกบ้าน

2.2 *An.aconitus* พบทั่วไปในพื้นที่ป่าเขาและที่ราบทุ่งนาทั่วประเทศ มีนิสัยชอบกัดสัตว์และคนนอกบ้าน และมีความชุกชุมสูงในช่วงฤดูฝน

2.3 *An.pseudowillmori* เป็นยูงในกลุ่ม *An.maculatus* เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* และ *P.vivax* ในท้องที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

การแพร่เชื้อมาลาเรียสู่คน

1. ยูกันปล่องที่มีเชื้อมาลาเรียระยะ sporozoite ในต่อมน้ำลายกัด เป็นวิธีการติดต่อทางธรรมชาติที่พบมากที่สุด

2. จากมารดาที่มีเชื้อมาลาเรียในร่างกายและถ่ายทอดทางรกไปสู่ทารกในครรภ์ วิธีนี้พบไม่มากนักในพื้นที่ที่มีมาลาเรียชุกชุม

3. โดยการได้รับเลือดจะพบในผู้บริจาคเลือดที่มีความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดระดับต่ำและไม่มีอาการ ซึ่งไม่ได้ทำการตรวจหาเชื้อมาลาเรียก่อนหรือตรวจหาเชื้อแต่ไม่พบ เนื่องจากปริมาณเชื้อมีต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีทั่วไป

อาการและภาวะแทรกซ้อน

โดยทั่วไปอาการแสดงของโรคประกอบด้วยอาการไข้หนาวสั่นต่อมาจะมีเหงื่อออกมากแล้วอาการดังกล่าวจะหายไปแต่จะมีอาการซ้ำเช่นเดิมทุกวัน วันเว้นวันหรือวันเว้น 2 วันขึ้นกับชนิดของเชื้อมาลาเรีย (malarial paroxysm) สำหรับภาวะแทรกซ้อนที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตในผู้ป่วยมาลาเรียเกิดจากการติดเชื้อ *P.falciparum* เพื่อเป็นการกำหนดข้อบ่งชี้ที่ชัดเจนในการแยกกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อรุนแรงหรือภาวะแทรกซ้อนของโรคมาลาเรียออกจากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไม่รุนแรง ซึ่งภาวะที่มีมาก่อนการติดเชื้อมาลาเรียที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมาลาเรียที่รุนแรงได้แก่ 1) การถูกตัดม้ามออก (splenectomy) 2) การตั้งครรภ์ โดยเฉพาะในครรภ์แรก (primigravida) 3) ภาวะภูมิคุ้มกันกดต่ำลง (immunosuppression) และ 4) ภาวะที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อมาลาเรียมาก่อน (non-immune to malaria)²⁶ จากการประชุมของคณะผู้เชี่ยวชาญองค์การอนามัยโลกในปี ค.ศ. 1990 ได้กำหนดอาการที่รุนแรงและภาวะแทรกซ้อนของมาลาเรียดังนี้²⁶

1. มาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria with unrousable coma) เป็นภาวะที่ทำให้ผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียมีอาการไม่รู้สึกรู้ตัว ไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นโดยไม่ได้มีสาเหตุจากการติดเชื้ออื่น ๆ นอกจากมาลาเรียหรือไม่ได้มีสาเหตุจากภาวะระดับน้ำตาลในเลือดต่ำหรือภาวะความไม่สมดุลของเกลือแร่ในร่างกายหรือสาเหตุอื่น ๆ เช่น ไข้สูงและชักในเด็ก เป็นต้น ภาวะมาลาเรียขึ้นสมองเป็นภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงที่พบบ่อยและเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญ โดยอาจพบมากถึงร้อยละ 10 ของผู้ป่วยมาลาเรียที่รับการรักษาในโรงพยาบาลและเป็นสาเหตุการตายร้อยละ 80 โดยทั่วไปภาวะมาลาเรียขึ้นสมองมักเกิดขึ้นภายหลังจากมีอาการไข้หลายวันในผู้ใหญ่ แต่ในเด็กมักเกิดขึ้นเร็วภายใน 2 วันแรกที่มีไข้ ในอดีตผู้ป่วยมาลาเรียที่มีอาการปวดศีรษะ คอแข็ง ชักร่วมกับมีไข้สูงหรือมีอาการผิดปกติทางสมองเฉพาะที่ แม้ว่าจะระดับการรู้สึกตัวยังไม่เสียไปก็มักจะทำให้การวินิจฉัยว่ามีภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง²⁷

ภาวะมาลาเรียขึ้นสมองในเด็กนั้นต้องคำนึงถึงการแยกโรคจากอาการชักและหมดสติเมื่อมีอาการไข้สูง

ดังนั้นการวินิจฉัยภาวะมาลาเรียขึ้นสมองในเด็กที่มีอาการหมดสติและมีไข้สูงต่อเมื่อภาวะการหมดสติเกิดขึ้นติดต่อกันนานกว่า 30 นาทีภายหลังจากมีอาการชัก เป็นที่น่าสังเกตว่าระยะเวลาที่พ้นจากภาวะมาลาเรียขึ้นสมองภายหลังให้ยารักษามาลาเรีย โดยเฉลี่ยจะเร็วกว่าในผู้ใหญ่คือ ภายใน 1-2 วัน ในขณะที่ผู้ใหญ่จะใช้เวลาประมาณ 2-4 วัน²⁸

2. ภาวะซีดรุนแรงที่เม็ดเลือดมีขนาดปกติ (severe normocytic anemia) เป็นภาวะโลหิตจางที่ขนาดเม็ดเลือดแดงปกติ มีค่า hematocrit ต่ำกว่าร้อยละ 15 หรือ hemoglobin น้อยกว่า 5 ก./ดล. ในขณะที่มี parasitemia มากกว่า 10,000 ต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ถ้ากรณีที่มีเม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็กกว่าปกติและสีซีดต้องแยกโรคจากภาวะร่างกายขาดธาตุเหล็กหรือโรคเลือดที่มีสาเหตุทางพันธุกรรม เช่น โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) และภาวะผิดปกติของฮีโมโกลบิน (hemoglobinopathy) โดยทั่วไปภาวะโลหิตจางรุนแรงมักพบได้บ่อยในผู้ป่วยมาลาเรียที่มีอาการรุนแรง²⁹

3. ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ภาวะนี้ผู้ป่วยจะมีปริมาณปัสสาวะน้อยกว่า 400 มล. ใน 24 ชั่วโมง สำหรับผู้ใหญ่ หรือน้อยกว่า 12 มล./กก. ใน 24 ชั่วโมงในเด็ก และไม่ตอบสนองต่อการให้น้ำเข้าสู่ร่างกาย ระดับ creatinine ในซีรัมมีค่ามากกว่า 3.0 มก./ดล. ภาวะไตวายมักพบในประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* ที่รุนแรง โดยพบว่าร้อยละ 30 ของผู้ป่วยที่มีภาวะมาลาเรียขึ้นสมองจะมีระดับ creatinine ในซีรัมสูงกว่า 2 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และค่า blood urea nitrogen สูงกว่า 40 มก./ดล. โดยทั่วไปผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายจากการติดเชื้อมาลาเรียมักพบอุบัติการณ์ของภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงอื่น ๆ ร่วมด้วย ได้แก่ ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ ภาวะดีซ่าน และน้ำท่วมปอด เป็นต้น^{30,31}

4. ภาวะน้ำท่วมปอด (pulmonary edema) เป็นภาวะที่รุนแรงและเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญอาจเกิดขึ้นภายหลังจากได้รับการรักษามาลาเรีย ชนิด *P.falciparum* เพียงไม่กี่วัน สาเหตุของการเกิดภาวะน้ำท่วมปอดจากมาลาเรียยังไม่ทราบชัดเจนภาวะดังกล่าวคล้ายคลึง

กับ adult respiratory distress syndrome (ARDS) สาเหตุส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการให้สารน้ำเข้าสู่ร่างกายมากเกินไป ทำให้เกิดภาวะการคั่งของสารน้ำในร่างกาย (fluid overload) อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่ไม่ได้รับน้ำมากเกินไปก็เกิดภาวะดังกล่าวได้^{32,34}

5. ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia)

ระดับน้ำตาลในเลือด (whole blood glucose) ต่ำกว่า 2.2 มิลลิโมลต่อลิตร หรือน้อยกว่า 40 มก./ดล. เป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อยจากการติดเชื้อมาลาเรีย ในผู้ป่วยที่ระดับการรู้สึกตัวยังดีจะมีอาการกระวนกระวายใจ กระหืดกระหอบ บัสสาวะน้อยลง รู้สึกหนาว หัวใจเต้นเร็ว หรือเวียน ในกรณีที่รุนแรงระดับการรู้สึกตัวจะเสียไปจนถึงโคมา (coma) การเกร็งด้าน extensor อาการชักกระตุกทั่วตัวและภาวะช็อก ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำพบได้ในผู้ป่วยมาลาเรียที่อยู่ในภาวะต่อไปนี้ได้แก่ผู้ป่วยที่ได้รับยาควินิน (quinine) หรือควินิดิน (quinidine) หมิงตั้งครรภ์ และในผู้ป่วยที่มีอาการของโรคมาลาเรียรุนแรงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็ก³⁵⁻³⁸

6. ภาวะระบบการไหลเวียนล้มเหลว (circulatory collapse, shock, algid malaria) เป็นภาวะที่ความดันโลหิตลดต่ำลงโดยมีค่าความดัน systolic ต่ำกว่า 50 มิลลิเมตรปรอท ในเด็กต่ำกว่า 5 ปี หรือต่ำกว่า 70 มิลลิเมตรปรอท ในผู้ใหญ่ ร่วมกับอาการมือเท้าเย็น และอุณหภูมิที่ผิวหนังกับอุณหภูมิภายในร่างกาย (core-skin temperature) ต่างกันมากกว่า 10 °ซ. หลอดเลือดดำที่อยู่บริเวณผิวและแขนขาจะหดตัว ภาวะระบบการไหลเวียนล้มเหลวนี้นักพบร่วมกับภาวะน้ำท่วมปอด metabolic acidosis ภาวะ septicemia จากการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลอบ หรือจากการเสียเลือดปริมาณมากจากทางเดินอาหาร²⁷

7. ภาวะเลือดออกหรือแข็งตัวผิดปกติ (spontaneous bleeding, disseminated intravascular coagulation) ภาวะการมีเลือดออกเองจากเหงือก จมูก ทางเดินอาหาร ชลช และอาจพบร่วมกับภาวะ disseminated intravascular coagulation (DIC) ภาวะดังกล่าวพบได้น้อยกว่าร้อยละ 10 ในผู้ป่วยที่เป็นมาลาเรียขึ้นสมองในผู้ใหญ่และพบน้อยมากในเด็ก³⁹

8. การชักทั้งตัวที่เกิดขึ้นซ้ำๆ กัน (repeated generalized convulsion) หมายถึง การเกิดอาการชักกระตุกทั้งตัวเกิดขึ้นติดต่อกันมากกว่า 2 ครั้ง ในเวลา 24 ชั่วโมง สาเหตุของการชัก ในเด็กอาจเกิดจากภาวะไข้สูง (febrile convulsion) หรือสาเหตุจากภาวะอื่น ๆ เช่น น้ำตาลในเลือดต่ำหรือการเปลี่ยนแปลงในระบบสมดุลของเกลือแร่ในร่างกาย ตลอดจนภาวะมาลาเรียขึ้นสมองหรือภาวะติดเชื้อแทรกซ้อนอื่น ๆ²⁶

9. ภาวะเลือดเป็นกรด (acidemia/acidosis) หมายถึง ภาวะที่มี arterial pH ต่ำกว่า 7.25 หรือ bicarbonate ในพลาสมาต่ำกว่า 15 มิลลิโมลต่อลิตร ภาวะเลือดเป็นกรดนี้มักพบร่วมกับผู้ป่วยที่มีภาวะระบบการไหลเวียนล้มเหลว ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ ภาวะที่มีเชื้อในเลือดสูงมาก (hyperparasitemia) หรือในภาวะไตวาย⁴⁰⁻⁴²

10. ภาวะที่มีฮีโมโกลบินในปัสสาวะสาเหตุจากเชื้อมาลาเรีย (malarial hemoglobinuria, blackwater fever) หมายถึง ภาวะที่เม็ดเลือดแดงแตกตัวในระบบไหลเวียนอย่างรุนแรงจนทำให้ตรวจพบ hemoglobin ในปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีภาวะมาลาเรียรุนแรง เช่น เกิดภาวะไตวาย ความดันโลหิตต่ำ หรือมีอาการไม่รู้สึกตัวแต่ตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรียหรือพบน้อยมาก และผู้ป่วยอาจมีไข้ต่ำ ๆ หรือไม่มี มักพบในผู้ป่วยชาวยุโรปที่เคยอาศัยอยู่ในแหล่งระบาดของมาลาเรียหลาย ๆ เดือน และเคยเป็นมาลาเรียมาก่อน โดยผู้ป่วยเหล่านี้มักจะมีประวัติการกินยาป้องกันมาลาเรีย quinine หรือ halofantrine หรือมีภาวะ G-6-PD deficiency ผู้ป่วยจะมีอาการปวดบริเวณขาหนีบ อาเจียน ท้องเสีย ปัสสาวะมาก และตามด้วยปัสสาวะน้อยลงต่อมา และพบสีปัสสาวะเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ⁴³⁻⁴⁵

11. ภาวะที่มีเชื้อในเลือดสูงมาก (hyperparasitemia) ความสัมพันธ์ระหว่าง parasitemia และอาการรุนแรงของมาลาเรียขึ้นอยู่กับความแตกต่างในกลุ่มประชากร อายุ และภาวะทางภูมิคุ้มกัน แต่โดยทั่วไปถ้าพบว่ามี parasitemia สูงมาก ๆ มักจะมีความสัมพันธ์กับอาการของโรคที่รุนแรง เช่น มากกว่าร้อยละ 5 เป็นต้น จะเป็นอันตรายต่อผู้ที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตาม parasitemia ไม่ได้เป็นตัวบ่งบอกถึงปริมาณเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยเนื่องจากเชื้อ

มาลาเรียชนิด *P.falciparum* ระยะที่เกินระยะวงแหวนจะมีภาวะ sequestration ใน visceral blood ทำให้สิ่งที่ตรวจพบเป็นเพียงประชากรบางกลุ่มบางระยะของเชื้อเท่านั้น²⁶

12. ภาวะดีซ่าน (jaundice) ภาวะดีซ่านที่ค่าบิลิรูบิน (bilirubin) ในซีรัมมากกว่า 50 ไมโครโมลต่อลิตร หรือมากกว่า 3.0 มก./ดล. พบได้บ่อยในผู้ใหญ่โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงอื่นๆ ร่วมด้วย อย่างไรก็ตามมักไม่พบอาการอื่น ๆ ของภาวะตับวายชัดเจน แม้ว่าหน้าที่การทำงานของตับจะเปลี่ยนไปบ้างหรือตรวจร่างกายมักพบว่าตับและม้ามโต ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่มีภาวะดีซ่าน มักจะมีค่า total bilirubin และ indirect bilirubin สูงขึ้นอันเป็นผลจากการแตกของเม็ดเลือดแดง⁴⁶

13. ภาวะที่มีไข้สูงมาก (hyperpyrexia) โดยอุณหภูมิของร่างกายที่วัดจาก rectum สูงมากถึง 40 °ซ. ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่พบได้บ่อยในผู้ป่วยมาลาเรียรุนแรง ภาวะที่มีไข้เกิดขึ้นใกล้เคียงกับช่วงเวลาที่ย้อมมาลาเรียอยู่ในระยะ schizogony ภาวะ hyperpyrexia มักพบในเด็กซึ่งถ้ามีอุณหภูมิสูง 38.5 °ซ. มักเสี่ยงต่อการชักตามมาได้ ถ้าอุณหภูมิระหว่าง 39.5 ถึง 42 °ซ. ผู้ป่วยจะซึมลง และถ้าสูงกว่า 42 °ซ. จะหมดสติได้ ภาวะไข้สูงเป็นเวลานานในเด็กอาจส่งผลต่อความผิดปกติในระบบประสาทตามมาได้ หญิงตั้งครรภ์ที่มีไข้สูงจะเสี่ยงต่อภาวะ fetal distress^{47,48}

การวินิจฉัยโรค

1. ผู้ป่วยมีประวัติอยู่ในท้องที่มีการแพร่กระจายของมาลาเรียหรือเดินทางไปยังเขตปรากฏโรคมาลาเรีย
2. มีอาการไข้หนาวสั่นหรือไข้เพียงอย่างเดียว
3. ตรวจร่างกายอาจพบตับ ม้ามโต แต่ไม่จำเป็นต้องพบเสมอไป
4. วินิจฉัยแยกจากโรคอื่น ๆ ที่มีอาการคล้ายโรคมาลาเรีย
5. การตรวจทางห้องปฏิบัติการพบเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งระยะที่เชื้อเจริญในเม็ดเลือดแดงโดยไม่อาศัยเพศ หรือร่องรอยของเชื้อมาลาเรีย

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ⁴⁹

1. การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือด การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ยังเป็นวิธีที่ดีซึ่งนิยมใช้กันอยู่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน ด้วยการย้อมด้วยสี giemsa จำแนกเป็น

1.1 การตรวจด้วยฟิล์มเลือดบาง (thin blood film) โดยการไถเลือดผู้ป่วยเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนแผ่นสไลด์และย้อมสี สามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อโดยการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื้อมาลาเรีย คัดอัตราเป็นร้อยละของเม็ดเลือดที่ติดเชื้อ

1.2 การตรวจด้วยฟิล์มเลือดหนา (thick blood film) โดยการหยดลงบนสไลด์ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้วปล่อยให้เชื้อมาลาเรียออกมาในระหว่างการย้อมสี สามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อ โดยการนับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว 200 ตัว การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จากการย้อมฟิล์มเลือดด้วยสี giemsa มีข้อดี คือการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดหนา มีความไวสูง แต่ผู้ตรวจต้องมีความเชี่ยวชาญ วิธีนี้สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียได้แม้มีจำนวนเพียงเล็กน้อย เช่น เชื้อ 40 ตัวในเลือด 1 ไมโครลิตร นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะในการจำแนก *P.falciparum* ออกจาก *P. vivax* และเป็นวิธีที่เหมาะสมในทางปฏิบัติเพื่อวินิจฉัยโรคทางคลินิก ตลอดจนเป็นวิธีที่ตรวจได้ง่ายและยังสามารถบอกลักษณะรูปร่างของเชื้อมาลาเรีย แต่มีข้อจำกัดในการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ๆ ออกจากกัน รวมทั้งการติดเชื้อผสม (mixed species infection) มักได้รับการวินิจฉัยต่ำกว่าที่เป็นจริง

2. การตรวจหาโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่พบในกระแสเลือด การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียมีหลายวิธี แต่ที่ได้รับการพัฒนาวิธีการตรวจจนสามารถผลิตในรูปของชุดตรวจสำเร็จรูปโดย immunochromatographic test โดยการใช้ monoclonal antibody ต่อ circulating antigen ของเชื้อมาลาเรีย การตรวจโดยอาศัยเลือดหรือซีรัมของผู้สงสัยว่าจะมีการติดเชื้อมาลาเรีย ผลที่ได้จะพบแถบสีที่ จำเพาะบนแผ่นกระดาษกรอง ชุดตรวจสำเร็จรูปที่มีการนำมาประเมินผลในปัจจุบันและได้ผลค่อนข้างดี

คือการตรวจหา histidine-rich protein II (HRP II) หรือ การตรวจหา lactate dehydrogenase (pLDH) ของเชื้อ มาลาเรีย วิธีนี้มีความไวทัดเทียมกับการตรวจโดยใช้ฟิล์ม เลือดหนาที่ย้อมสี giemsa นอกจากนี้ปัจจุบันผลที่ได้จาก การใช้ชุดทดสอบนี้ให้ผลดีเฉพาะ *P.falciparum* เท่านั้น

3. การตรวจหา DNA ของมาลาเรีย เป็นวิธีที่ให้ความไวและความจำเพาะดีกว่าวิธีอื่น ๆ หลักการสำคัญ คือการเพิ่มปริมาณ DNA ของมาลาเรียโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยการ แยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวด้วยความร้อน เพื่อทำลาย พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบส หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงในระดับที่ primer ซึ่งเป็น oligonucleotide สายเดี่ยวมาจับ อย่างจำเพาะกับ DNA ต้นแบบในตำแหน่งที่มีลำดับเบส ที่ complementary กับ primer และอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาในการสร้างสาย DNA ใหม่ที่มีลำดับเบสเหมือนสาย DNA ต้นแบบ ความไว และความจำเพาะขึ้นกับการออกแบบ primers และยื่น เป้าหมาย โดยทั่วไปยื่นที่เหมาะสมและนิยมใช้คือยื่น small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) แต่ในปัจจุบัน พบว่า primers จากยีน mitochondrial cytochrome b ให้ความไวมากกว่า primers จากยีน SSU rRNA โดย ความจำเพาะยังคงดีเช่นเดียวกันและสามารถจำแนกเชื้อ มาลาเรียทั้ง 5 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ การตรวจหา DNA ของมาลาเรียในเลือดแล้ว ยังพบว่าการ ตรวจด้วยวิธี PCR ด้วย primers จากยีน mitochondrial cytochrome b สามารถตรวจวินิจฉัยโดยใช้ตัวอย่างน้ำลาย และปัสสาวะของผู้ป่วยโดยให้ความไวไม่แตกต่างจากการ ตรวจด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers จากยีน SSU rRNA

การรักษา

การรักษามาลาเรียประกอบด้วย การรักษาจำเพาะ การบำบัดอาการและภาวะแทรกซ้อน การป้องกัน การแพร่ โรค การรักษาจำเพาะ คือการกำจัดเชื้ออันเป็นต้นเหตุของ โรคคือระยะที่เจริญโดยไม่มีเพศในเม็ดเลือดแดง²⁶

1. การรักษามาลาเรีย *P.falciparum* สำหรับ ในประเทศไทยเชื้อ *P.falciparum* มีการดื้อต่อยาต้าน

มาลาเรียหลายขนาน เช่น chloroquine และ sulfadoxine-pyrimethamine เป็นต้น จึงต้องมีการปรับเปลี่ยนสูตรการ ใช้ยาแตกต่างกันบ้างตามท้องที่ และมักต้องใช้ยาหลาย ขนานร่วมกัน สำหรับยาที่ยังมีประโยชน์ในการรักษาการ ติดเชื้อ *P.falciparum* เช่น mefloquine, artemether หรือ artesunate, quinine และยาอื่น ๆ ที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่ ในปัจจุบัน เป็นต้น ในกรณีผู้ป่วยมีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง ต้องรับไว้รักษา ในโรงพยาบาลเพื่อแก้ไขภาวะดังกล่าว ตามระบบ

2. การรักษามาลาเรีย *P.vivax* และ *P.ovale* มาลาเรียสองชนิดนี้ยังไวต่อ chloroquine และเพื่อ ป้องกันการเกิดไขกลับซ้ำต้องให้ยาฆ่า hypnozoite คือ primaquine เพื่อให้หายขาด

3. การรักษามาลาเรีย *P.malariae* และ *P.knowlesi* ให้รับประทาน chloroquine แต่ไม่ต้องให้ primaquine เพราะไม่มี hypnozoite

วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

ประวัติความเป็นมาของการพัฒนาวัคซีน

แม้ว่าการติดเชื้อมาลาเรียไม่สามารถป้องกันการ ติดเชื้อมาลาเรียซ้ำในภายหลัง แต่ในพื้นที่ที่มีการแพร่ ระบาดของโรคมาลาเรียที่รุนแรง เช่น ในบริเวณตอนล่าง ของทะเลทรายซาฮาร่ามักเป็นที่ทราบกันว่าผู้ที่ติดเชื้อ มาลาเรียซ้ำหลายครั้งสามารถสร้างภูมิคุ้มกันที่ช่วยลด ความรุนแรงจากโรคมาลาเรียได้โดยภาวะแทรกซ้อน ที่ รุนแรงจะลดลง อาการของโรคมาลาเรียที่ไม่รุนแรงนี้มักพบ ได้ในเด็กที่รอดชีวิตภายหลัง 5 ขวบปีแรก หลังจากนั้นใน สภาวะที่ได้รับเชื้ออย่างสม่ำเสมอ ภูมิคุ้มกันดังกล่าว จะได้รับการพัฒนาขึ้นโดยลำดับทำให้พบว่าผู้ใหญ่ส่วนหนึ่ง จะมีภูมิคุ้มกันต่ออาการของโรคมาลาเรีย โดยยังตรวจพบ เชื้อมาลาเรียระยะเจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง โดยไม่มีอาการของโรคเลยหรือเกิดภูมิคุ้มกันทางคลินิก (clinical immunity)⁵⁰⁻⁵³ ซึ่งในปี ค.ศ.1961 และ 1962 ได้มีการทดลองใช้ภูมิโนโกลบูลินจากผู้ใหญ่ที่มีภาวะ ของ clinical immunity ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเด็กในแอฟริกา

พบว่าสามารถป้องกันเด็กเหล่านี้จากอาการของโรค มาลาเรียได้ 54,55 ใน ค.ศ. 1991 ได้มีการทดลองซ้ำ ดังกล่าวในเด็กไทยพบว่าให้ผลสอดคล้องกัน โดยพบว่า แอนติบอดีชนิด IgG นั้นให้ผลจำเพาะต่อระยะของเชื้อ มาลาเรีย แต่ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นไม่ทำให้เชื้อหายไปจาก กระแสเลือดแต่สามารถทำให้ปริมาณเชื้อในร่างกายลดลง ขณะได้รับภูมิคุ้มกัน 56

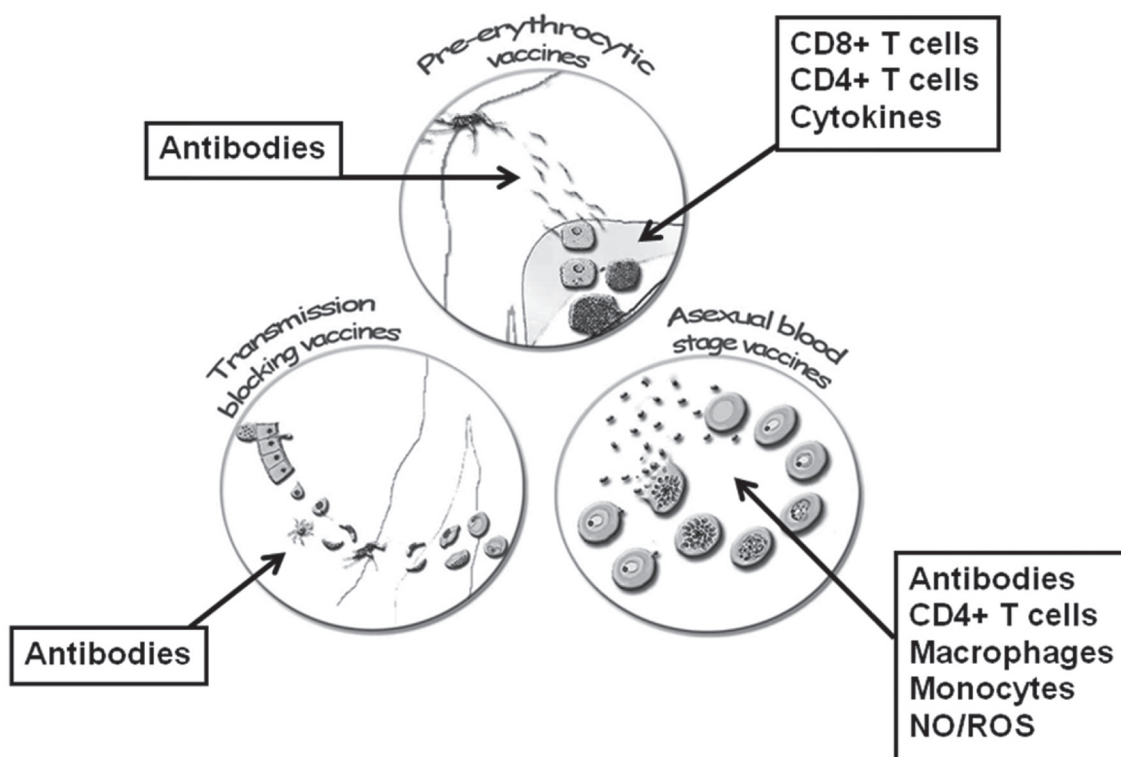
สำหรับการพัฒนาวัคซีนโดยใช้เชื้อมาลาเรียใน สัตว์ทดลองครั้งแรกเริ่มขึ้นในช่วงปี ค.ศ. 1941 ถึง 1942 โดยใช้ sporozoite ของ *Plasmodium gallinaceum* ที่ ผ่านการฉายรังสีอุลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) ฉีดเข้าไป ในสัตว์ปีก พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อ การติดเชื้อมาลาเรียได้^{57,58} ต่อมาในปี ค.ศ. 1967 ได้มี การทดลองกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูต่อการติดเชื้อ *Plasmodium berghei* โดยฉีด sporozoite ของเชื้อมาลาเรีย ดังกล่าวที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ (X-irradiated sporozoite) เข้าหลอดเลือดดำ หลังจากนั้นได้ทำการฉีดเชื้อมาลาเรีย ระยะ sporozoite ที่สามารถก่อโรครุนแรงเข้าไปในหนู พบว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการฉีดเชื้อที่ผ่านการฉายรังสี เอ็กซ์ สามารถป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์ (complete protection)^{59,60} จากการวิเคราะห์ต่อมาพบว่า หนูมีการสร้างแอนติบอดีที่สามารถทำให้โปรตีนบนผิวของ ระยะ sporozoite เกิดการเกาะกลุ่ม (precipitation) รอบ ๆ sporozoite ในหลอดทดลอง จึงเรียกชื่อโปรตีนดังกล่าว ว่า circumsporozoite protein (CSP) นอกจากนี้ยังพบว่า แอนติบอดีต่อ CSP ทำให้ sporozoite ไม่สามารถ ก่อโรคต่อไปได้⁶⁰ จุดเริ่มต้นเหล่านี้พร้อมกับพัฒนาการ ทางเทคโนโลยีอนุชีววิทยาและความสามารถในการเลี้ยง เชื้อ *P. falciparum* ระยะที่เจริญในเม็ดเลือดแดงได้อย่าง ต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการ ทำให้มีการค้นพบแอนติเจนของ เชื้อมาลาเรียระยะต่าง ๆ อย่างมากในภายหลังจนปัจจุบัน โดยลำดับ

หลักการพัฒนาวัคซีน

แม้ว่าในวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย ประกอบด้วย ระยะต่างๆ ที่มีคุณลักษณะทางชีววิทยาตลอดจนการเจริญ

ในเซลล์ของโฮสต์ที่แตกต่างกัน ทำให้การตอบสนองของ ระบบภูมิคุ้มกันที่มีผลในการทำลายเชื้อมีความซับซ้อน และแตกต่างกันด้วย ส่วนหนึ่งเนื่องจากแอนติเจนที่เป็น องค์ประกอบและชนิดของเซลล์ที่โฮสต์เข้าไปเจริญ ในการ จัดกลุ่มของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียจึงมักคำนึงถึงช่วง เวลาที่เชื้อเจริญในโฮสต์เป็นหลัก โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ 1) pre-erythrocytic stage vaccines เป็นวัคซีนที่มีเป้าหมายในการทำลายระยะ sporozoite และระยะที่เชื้อ เจริญในเซลล์ตับ วัคซีนที่ให้ผลสัมฤทธิ์ดังกล่าวจะทำให้ ผู้ได้รับวัคซีนไม่มีอาการของโรค โดยเชื้อจะถูกทำลายไป ก่อนที่จะมีการเจริญอย่างสมบูรณ์ในเซลล์ตับ จึงไม่มีโอกาส เกิดการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดงตามมา 2) asexual blood-stage vaccines มีเป้าหมายในการทำลายเชื้อมาลาเรีย ที่เจริญในเม็ดเลือดแดงโดยไม่อาศัยเพศ ผลสัมฤทธิ์ของ วัคซีนในกลุ่มนี้คือการทำลายเชื้อในเม็ดเลือดแดงก่อนที่จะ มีการเพิ่มจำนวนจนก่ออาการของโรค อย่างไรก็ตามผู้ที่ได้ รับวัคซีนดังกล่าวเมื่อได้รับเชื้อจากยุงพาหะ จะพบว่าระยะ sporozoite และระยะที่เจริญในเซลล์ตับจะมีพัฒนาการได้ ตามปกติ 3) transmission-blocking vaccines เป็นวัคซีน ที่มุ่งในการทำลาย gamete, zygote และ ookinete ดังนั้นจึงเป็นการยับยั้งขั้นตอนการสร้าง sporozoite ซึ่งเป็น ระยะติดต่อ ดังนั้นวงจรการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย จึงยุติลง ทั้งนี้ผู้ได้รับวัคซีนในกลุ่มนี้จะเป็นโรค มาลาเรียตามปกติ แต่ผลประโยชน์ที่ได้จะเกิดขึ้นในระดับ ชุมชน (รูปที่ 2)⁶¹

เนื่องจากการติดเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียใน ภายหลังได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นแม้ว่าเป้าหมายของวัคซีน ในอุดมคติคือการสร้างภูมิคุ้มกันที่สมบูรณ์หรือ sterile immunity แต่ในทางปฏิบัติผลสัมฤทธิ์ของวัคซีนป้องกัน โรคมาลาเรียยังไม่สามารถบรรลุเป้าหมายดังกล่าวใน ปัจจุบัน อย่างไรก็ตามในช่วงศตวรรษที่ผ่านมาวัคซีน ป้องกันโรคมาลาเรียได้รับการพัฒนาอย่างมากพร้อมกับ องค์ความรู้ในด้านต่างๆ มากขึ้น สำหรับโปรตีนที่ เป็นเป้าหมายในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและมี ศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นองค์ประกอบของวัคซีนที่



รูปที่ 2 ชนิดของวัคซีนตามเป้าหมายในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อมาลาเรียตามระยะในวงจรชีวิต โดยระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ของโฮสต์ (รูปโดยสมชาย จงวุฒิเวศย์ และ อุรัสยา พัฒนวงศ์)

สำคัญมีดังนี้

1. โปรตีนที่มีศักยภาพเป็นองค์ประกอบของวัคซีนจากระยะก่อนเข้าเม็ดเลือดแดง (pre-erythrocytic stage vaccine candidates)

จากการศึกษาการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย *P.berghei* และ *Plasmodium yoelii* ในหนูทดลองพบว่า เมื่อ sporozoite จากต่อมน้ำลายยุงเข้าสู่ผิวหนังขณะยุงดูดเลือดนั้น sporozoite ส่วนหนึ่งซึ่งอาจมากถึงร้อยละ 50 จะยังคงอยู่บริเวณผิวหนังในตำแหน่งที่ถูกยุงกัดเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรืออาจนานได้ถึง 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นประมาณ 1 วันจะพบว่าประมาณร้อยละ 10 ของ sporozoite ที่อยู่บริเวณดังกล่าวจะพัฒนาต่อไปเป็นระยะที่เจริญนอกเม็ดเลือดแดงหรือ exo-erythrocytic stages ดังเช่นที่พบในเซลล์ตับ โดยพบที่เซลล์ในส่วนของ epidermis, dermis และบริเวณ hair follicle ซึ่ง merozoite ที่พัฒนาขึ้นเหล่านี้จะแตกออกจากเซลล์ในลักษณะของ merozoites ที่มีเยื่อหุ้มเช่นเดียวกับที่แตกออกจากเซลล์ตับ โดย

merozoite เหล่านี้สามารถลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ต่อไป ในขณะที่ประมาณร้อยละ 30 ของ sporozoite ที่เข้าสู่ร่างกายจากยุงกัดนั้นจะเดินทางไปตามท่อน้ำเหลืองเพื่อไปยังต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้เคียง ทั้งนี้ sporozoite ส่วนใหญ่จะถูกทำลายในต่อมน้ำเหลืองภายใน dendritic cells ส่วนที่เหลือจะพัฒนาต่อไปเป็น exo-erythrocytic stages ในเซลล์ดังกล่าว สำหรับ sporozoite ส่วนใหญ่ที่มาจากยุงนั้นจะเดินทางต่อไปสู่กระแสเลือดเพื่อเข้าสู่เซลล์ตับต่อไป⁶²⁻⁶⁴ องค์ความรู้ดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่ามีความสำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย รวมทั้งพยากรณ์กำเนิดของโรคมาลาเรีย ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไป

ระยะ sporozoite ของเชื้อมาลาเรียมีรูปร่างคล้ายหนอนขนาดเล็กมีความยาวประมาณ 10 ถึง 15 ไมครอน และกว้าง 1 ไมครอน ที่ปลายด้านหนึ่งมี apical organelle เพื่อใช้ในการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ บนผิวของระยะ sporozoite ประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับเกาะติดกับเซลล์ตับรวมทั้งการเคลื่อนที่และลุกลามเข้า

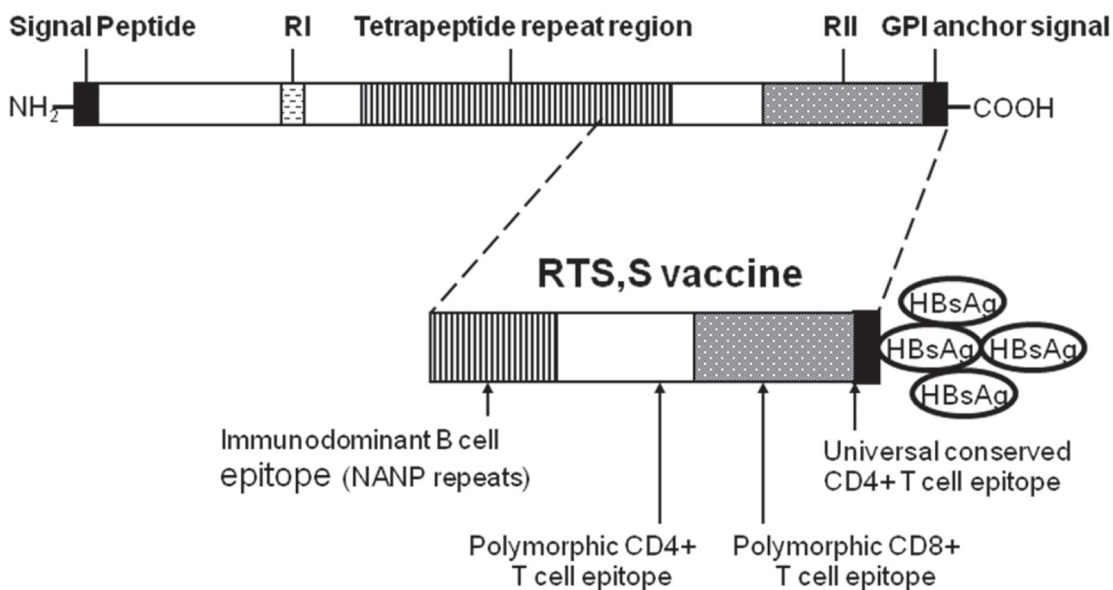
สู่เซลล์ ที่สำคัญ ได้แก่ circumsporozoite protein หรือ CSP, thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) และ sporozoite-threonine-asparagine-rich protein (STARP) ซึ่งมีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน

1.1 circumsporozoite protein เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดบนผิวของระยะ sporozoite มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันตั้งแต่ 40 ถึง 79 กิโลดาลตัน มีโครงสร้างโดยทั่วไปคล้ายกัน กล่าวคือด้าน N-terminus และ C-terminus ของโปรตีนประกอบด้วยบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันระหว่าง CSP ของเชื้อมาลาเรียต่าง species กันเรียกว่า region I และ region II ตามลำดับ (รูปที่ 3)⁶⁵ สำหรับบริเวณส่วนกลางของโปรตีนประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนเรียงตัวซ้ำกันเป็นชุด (repeats) ซึ่งใน CSP ของ *P.falciparum* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 ตัวเรียงตัวซ้ำกันเป็นชุด (tetrapeptide repeats) โดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน asparagine alanine asparagine และ proline (NANP) และส่วนน้อยประกอบด้วยกรดอะมิโน asparagine valine aspartic acid และ proline (NVDP) โดยจำนวนชุดของลำดับกรดอะมิโน

NANP และ NVDP มีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อ เช่น จากการศึกษาดังกล่าวชื่อ *P.falciparum* จากผู้ป่วยในประเทศไทยพบจำนวน tetrapeptide repeats ตั้งแต่ 40 ถึง 51 หน่วยแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อ⁶⁶ อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน CSP ยังไม่พบว่า *P.falciparum* มีองค์ประกอบของลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำกันดังกล่าวแตกต่างจากที่กล่าวข้างต้น ยกเว้นจำนวนชุดของ repeats ซึ่งบริเวณ repeats ใน CSP ของ *P.falciparum* ประกอบด้วย B cell epitope โดยแอนติบอดีต่อบริเวณดังกล่าวสามารถยับยั้งการลุกลามของ sporozoite เข้าสู่เซลล์ตับในการทดลองได้⁶⁷ และยับยั้งความสามารถในการเป็นระยะติดตัวของ sporozoite⁶⁸ นอกจากนี้แอนติบอดีชนิดโคลนเดี่ยว (monoclonal antibody) ต่อ repeats ของ CSP ของ *P.berghei* เมื่อฉีดเข้าหนูทดลองพบว่าสามารถป้องกันติดเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกัน⁶⁹ แอนติบอดีนี้อาจทำหน้าที่ปิดกั้นตัวจับ (ligand) และตัวรับ (receptor) ระหว่าง sporozoite กับเซลล์ตับ⁷⁰ หรือทำให้ sporozoite ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้⁷¹

บริเวณ C-terminus ของ CSP ประกอบด้วย

Circumsporozoite Protein



รูปที่ 3 โครงสร้างของ circumsporozoite protein และ วัคซีน RTS,S (ดัดแปลงจากรูปที่ 2 เอกสารอ้างอิงหมายเลข 61)

T helper epitope อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง เรียกว่า Th2R และ Th3R รวมทั้งพบ cytotoxic T cell epitope ในบริเวณใกล้เคียงและเหลื่อมกับ Th3R epitope (รูปที่ 3)⁷²⁻⁷⁶ ซึ่ง T cell epitope เหล่านี้มีรูปแบบการแทนที่ของเบสใน codon ของ epitope แตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อ ดังนั้นจึงเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายในลำดับเบสสูง และเป็นที่น่าสังเกตว่าการแทนที่ของเบสใน Th2R และ Th3R จะทำให้กรดอะมิโนใน codon นั้นเปลี่ยนชนิดเสมอ^{66,77,78} ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนนี้ ทำให้การตอบสนองของ T cell ต่อ epitope ดังกล่าวลดลงหรือไม่ตอบสนองเลย การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถอธิบายการหลบหลีกของเชื้อมาลาเรียต่อระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น การเกิด altered peptide ligand antagonism⁷⁸ จากการวิเคราะห์อัตราการแทนที่ของเบสใน codon ของ epitope เหล่านี้พบว่าความหลากหลายดังกล่าวเนื่องมาจากกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) ต่อบริเวณ epitope เหล่านี้⁶⁶ อย่างไรก็ตามอาจมีปัจจัยอื่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนอกเหนือจากผลของอิทธิพลจากภูมิคุ้มกันของโฮสต์⁷⁹

แม้ว่าแอนติบอดีต่อ tetrapeptide repeats ใน CSP ของ *P.falciparum* สามารถยับยั้งการลุกลามของ sporozoite เข้าเซลล์ตับและมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียจากการทดลองในอาสาสมัคร แต่ในธรรมชาติกลับพบว่าผู้ที่อยู่ในเขตปรากฏโรคมาลาเรียส่วนใหญ่มีแอนติบอดีต่อ repeats และยังคงติดเชื้อมาลาเรียได้เช่นเดียวกับผู้ที่ไม่มีแอนติบอดี แสดงว่าแอนติบอดีดังกล่าวไม่เพียงพอต่อการป้องกันโรคมาลาเรียได้ในธรรมชาติ^{80,81} โดยทั่วไปแอนติเจนที่ประกอบด้วย repeats มักมีความสามารถในการกระตุ้น B cell โดยไม่ต้องพึ่ง T cell (T-independent B cell stimulation)⁸² ในทางตรงข้าม T helper epitopes ใน CSP อาจมีความสำคัญในการร่วมมือกับ B cell (T-B cooperation) เพื่อให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มี avidity และ affinity ที่ดี ในขณะที่ cytotoxic T cell epitope อาจมีความสำคัญในการกระตุ้น cytotoxic T lymphocyte ให้ทำลายเซลล์ตับที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ภายใน แม้ว่า CSP ปรากฏที่ผิวของ sporozoite เป็นส่วนใหญ่ แต่

ในระยะเวลาที่เชื้อมาลาเรียอยู่ภายในเซลล์ตับในระยะแรก ๆ ที่เชื้อเจริญเติบโตนั้นสามารถตรวจพบ CSP ได้เช่นกัน^{83,84} ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนสำหรับ pre-erythrocytic stages จึงมุ่งหวังที่จะทำลายทั้งระยะ sporozoite และระยะที่เชื้อมาลาเรียเริ่มเจริญอยู่ในเซลล์ตับ

1.2 thrombospondin-related adhesive protein เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่ปรากฏบนผิวของ sporozoite ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90 กิโลดาลตัน^{85,86} จากการเปรียบเทียบโครงสร้างของ TRAP ในเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันพบว่าโครงสร้างโดยรวมคล้ายกัน กล่าวคือสามารถแบ่งได้เป็น 6 บริเวณ (domain) ได้แก่ 1) signal peptide อยู่ปลายสุดด้าน N-terminus 2) บริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับของ von Willebrand factor type A-domain 3) บริเวณที่มีตัวจับกับ sulfated glycosaminoglycan และมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ region II ของ CSP 4) บริเวณที่มีกรดอะมิโน proline และ asparagine อยู่ซ้ำกันหลายชุด 5) ส่วนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของมาลาเรียหรือ transmembrane domain และ 6) ในส่วนปลายด้าน C-terminus เป็นส่วนของ cytoplasmic tail จากการศึกษาลำดับเบสของยีน TRAP ของ *P.falciparum* และ *P.vivax* จากตัวอย่างในประเทศไทยเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากประเทศบราซิล พบความหลากหลายในรูปแบบของการแทนที่ของลำดับเบสในยีนทั้ง 2 หลายตำแหน่งและมีความแตกต่างกันตามภูมิภาคที่เชื้อมาลาเรียปรากฏอยู่⁸⁷⁻⁸⁹ การแทนที่ของเบสส่วนใหญ่เกิดขึ้นใน domain ที่ 2, 3 และ 4 ทั้งนี้การแทนที่ของเบสดังกล่าวมักทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดไป อันอาจเป็นผลจากกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติ

ในการศึกษาโดยวิธี immunofluorescence หรือ immuno-electron micrograph พบว่าทั้ง CSP และ TRAP ถูกเก็บไว้ใน microneme^{90,91} แต่การกระจายของ TRAP บนผิว sporozoite มีลักษณะเป็นหย่อม (patch) ในขณะที่ CSP มีการกระจายตัวสม่ำเสมอบนผิว sporozoite^{92,93} จากการทดลองใช้ TRAP และ CSP ของ *P.yoelli* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียของหนูเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน พบว่าเมื่อใช้โปรตีนทั้ง 2 ชนิดร่วมกันสามารถกระตุ้นให้หนู

เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์ แต่ถ้าใช้โปรตีนเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งพบว่าความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียดังกล่าวเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ แสดงว่าภูมิคุ้มกันที่ให้ประสิทธิภาพสมบูรณ์สำหรับวัคซีน pre-erythrocytic stages เป็นผลจากการกระตุ้นด้วยโปรตีนของระยะ sporozoite มากกว่า 1 ชนิด สำหรับบทบาทของ CSP และ TRAP นั้นมีหลักฐานสนับสนุนว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิดทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของ sporozoite และทำหน้าที่เป็นตัวจับโดยใช้บริเวณที่เรียกว่า region II plus กับตัวรับที่ปรากฏบนต่อมน้ำลายของตลอดจนตัวรับที่เป็น heparan sulfate proteoglycan ที่อยู่บริเวณ basolateral domain ของเซลล์ตับ

1.3 sporozoite threonine-asparagine-rich protein (STARP) เป็นโปรตีนขนาด 78 กิโลดาลตันพบใน sporozoite ประกอบด้วยกรดอะมิโน threonine และ asparagine ในปริมาณที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนอื่น ๆ ของมาลาเรีย จากการศึกษพบว่า STARP สามารถกระตุ้นให้ผู้ติดเชื้อสร้างแอนติบอดีที่มีผลยับยั้งการลุกลามของ sporozoite เข้าสู่เซลล์ตับ ยีน STARP มี intron ทางด้าน 5' ทำให้ยีนนี้ประกอบด้วย 2 exons โดย exon ที่ 1 ทางด้าน 5' มีขนาดสั้นประกอบด้วย 24 codons ในส่วนของ exon 2 เป็นบริเวณที่สร้างกรดอะมิโนที่เรียงซ้ำกันเป็นชุด 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยกรดอะมิโน 45 ตัวเรียงซ้ำกัน 2 ชุดหรืออาจมีเพียงชุดเดียว ถัดมาเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโน 10 ตัว เรียงซ้ำกัน 25-28 ชุด โดยแต่ละชุดมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนแตกต่างกันหลายรูปแบบอย่างเป็นระบบ อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเชื้อจากผู้ป่วยในประเทศไทย และภูมิภาคอื่นของโลกพบการแทนที่ของกรดอะมิโนในส่วนที่ไม่ใช่ repeats เพียง 5 ตำแหน่ง⁸⁶ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์แอนติบอดีชนิด IgG ต่อ PfSTARP พบว่าผู้ติดเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยให้ผลบวกร้อยละ 42.6 และพบว่าแอนติบอดีดังกล่าวมักจะอยู่ได้ไม่น้อยกว่า 6 เดือนภายหลังจากหายจากโรคแล้ว⁹⁴ แม้ว่าบทบาทของ STARP ในการลุกลามของ sporozoite เข้าสู่เซลล์ตับยังไม่ได้รับการพิสูจน์ชัดเจน แต่จากการใช้

เปปไทด์สังเคราะห์โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ STARP เพื่อทดสอบการจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ตับ Hep G2 พบว่าเปปไทด์จากส่วน N-terminus ถึง C-terminus และบริเวณ repeats ที่มีกรดอะมิโน 10 ตัวเป็นองค์ประกอบสามารถจับกับตัวรับบนเซลล์ดังกล่าวได้ รวมทั้งยังพบว่าวัคซีนที่มี STARP และโปรตีนอื่นจากระยะที่เชื้อเจริญในเซลล์ตับเป็นองค์ประกอบของวัคซีนสามารถกระตุ้นให้ลิง *Aotus* (owl monkey) ที่มีการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีและ T cell ต่อแอนติเจนในวัคซีนได้ แม้ว่าโปรตีนชนิดนี้จะมี repeats เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ แต่ความหลากหลายในรูปแบบของโปรตีนมีอย่างจำกัด ดังนั้นจึงนับว่ามีศักยภาพที่ดีในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน ซึ่งปัจจุบันยังมีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนนี้ไม่มาก

นอกจาก CSP, TRAP และ STARP ที่จัดว่าเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนต่อระยะ pre-erythrocytic stages แล้วยังมีโปรตีนอื่น ๆ ที่พบในระยะดังกล่าวและน่าจะมามีบทบาทในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน เช่น sporozoite and liver stage antigen (SALSA)⁹⁵ และ liver-stage-specific antigens 1, 2 และ 3 (LSA-1, 2, 3) เป็นต้น ทั้งนี้เมื่อ sporozoite ลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับและเริ่มมีการเจริญเติบโตเกิดขึ้นนั้น CSP ยังมีปฏิสัมพันธ์กับ proteasome complex ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ hepatocyte ทำให้ลดกระบวนการย่อยโปรตีนของเชื้อมาลาเรียให้มีขนาดเล็กลง (processing) ทำให้โอกาสที่โปรตีนของเชื้อมาลาเรียจะถูกนำขนส่งไปยังผิวของเซลล์ hepatocyte พร้อมกับ major histocompatibility complex (MHC) class I จึงลดลงไปด้วย ส่งผลให้โอกาสที่เชื้อมาลาเรียระยะดังกล่าวจะถูกทำลายโดย CD8+ cytotoxic T lymphocyte จึงลดลงเช่นกัน เนื่องจากการทดลองพบว่า CSP ที่ถูกขนส่งมายังผิวเซลล์ hepatocyte ร่วมกับ MHC class I นั้นเมื่อ CD8+ cytotoxic T lymphocyte มาสัมผัสกับเซลล์ดังกล่าวจะมีการหลั่ง interleukin-1, interleukin-6 และ nitric oxide เพื่อทำลายเซลล์ hepatocyte ที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ภายใน⁴³ ดังนั้นถ้าการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวสามารถทำได้ด้วยวัคซีนที่มีองค์ประกอบของโปรตีนจากระยะที่เชื้อ

มาลาเรียเจริญในเซลล์ตับประสพผลสำเร็จยอมทำให้การทำลายเชื้อในเซลล์ตับเกิดขึ้นได้

2. โปรตีนที่มีศักยภาพเป็นองค์ประกอบของวัคซีนจากระยะที่เจริญในเม็ดเลือดแดงโดยไม่อาศัยเพศ (asexual erythrocytic stage vaccine candidates)

โปรตีนที่สำคัญที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนเพื่อทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียระยะที่มีการเจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงมีดังนี้

2.1 merozoite surface protein 1 (MSP1) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงและเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดบนผิวของ merozoite มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อตั้งแต่ประมาณ 185 ถึง 200 kDa⁹⁷ และยังมีหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนสูง (antigenic polymorphism) ในประชากรเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ⁹⁸ ความหลากหลายของ MSP1 ของ *P. falciparum* (PfMSP1) เกิดจากยีนที่มีลักษณะพื้นฐานเพียง 2 รูปแบบ (allelic dimorphism) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนทำให้ทราบโครงสร้างพื้นฐานของยีนดังกล่าวว่าประกอบด้วยบริเวณที่มีความหลากหลายของเบสระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อสูง (variable block) บริเวณที่มีความหลากหลายปานกลาง (semi-conserved block) และบริเวณที่มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสสูง (conserved block) โดย variable block และ semi-conserved block มีลำดับเบสพื้นฐานเพียง 2 รูปแบบซึ่งสามารถจำแนกเป็น 17 บริเวณ (block)⁹⁹ ยกเว้น block 2 ประกอบด้วย tripeptide repeats ที่มีลำดับเบสพื้นฐาน 3 รูปแบบในตัวอย่าง *P. falciparum* ที่ได้จากผู้ป่วย¹⁰⁰ การเกิดความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนของ MSP1 นี้เนื่องจากการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างอัลลีล (allele) ที่ต่างกัน (intragenic recombination) ในขณะที่เชื้อมาลาเรียมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศในยุงกันปล่อง¹⁰¹ ทั้งนี้กลไกดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้จาก การวิเคราะห์ประชากรของ *P. falciparum* ในธรรมชาติโดยอาศัยการวิเคราะห์ตามหลักการทางพันธุกรรมประชากร¹⁰² อย่างไรก็ตามอัตราการเกิด recombination อาจแตกต่าง

กันไปตามภูมิภาคของโลกขึ้นกับความชุกของโรคมาลาเรีย และลักษณะทางภูมิศาสตร์ของเขตปรากฏโรค¹⁰³

โปรตีน MSP1 ของ *P. falciparum* ถูกสร้างขึ้นตั้งแต่ระยะ schizont ในรูปของ precursor protein หรือโปรตีนเริ่มต้นที่ต้องได้รับการปรับแต่ง หลังจากนั้นเมื่อเชื้อเจริญมากขึ้นจะมีการย่อยโปรตีนดังกล่าวให้มีขนาดเล็กลงโดยกระบวนการ 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรก (primary processing) จะให้โปรตีนมีขนาด 83 กิโลดาลตัน 30 กิโลดาลตัน 38 กิโลดาลตัน และ 42 กิโลดาลตันตามลำดับ สำหรับขั้นตอนที่สอง (secondary processing) ชิ้นส่วนขนาด 42 กิโลดาลตันจะถูกย่อยเป็น 2 ส่วนคือมีขนาด 33 กิโลดาลตัน ซึ่งจะถูกลอยไปตามกระแสโลหิต และขนาด 19 กิโลดาลตัน จะถูกนำเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไป^{97,104} พร้อมกับ merozoite จนเจริญเป็นระยะวงแหวน (ring stage) ชิ้นส่วนของโปรตีนซึ่งมีขนาด 19 กิโลดาลตันนี้เรียกว่า PfMSP-119 ประกอบด้วย epidermal growth factor (EGF)-like domain จำนวน 2 แห่ง จากข้อมูลในห้องปฏิบัติการและการศึกษาในเชิงระบาดวิทยา พบว่า PfMSP119 เป็นเป้าหมายที่เหมาะสมในการเป็นองค์ประกอบหนึ่งของวัคซีนป้องกันมาลาเรียสำหรับ *P. falciparum*¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ เนื่องจากแอนติบอดีต่อโปรตีนนี้สามารถยับยั้งการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดง ตลอดจนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในหลอดทดลอง^{104,108} รวมทั้งการทดลองใช้ PfMSP1 เป็นองค์ประกอบของวัคซีนพบว่าสามารถกระตุ้นให้ลิง *Aotus* สร้างภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ โดยมีประสิทธิภาพการป้องกันโรคได้อย่างสมบูรณ์ กล่าวคือไม่พบการติดเชื้อเลยหรืออาจเกิดการป้องกันโรคขึ้นได้บางส่วน (partial protection) กล่าวคือลิงดังกล่าวมีปริมาณเชื้อในเลือดในระดับต่ำมากและอาจหายได้เองในภายหลังหรือมีระยะพักตัวนานขึ้น¹⁰⁹⁻¹¹¹ นอกจากนี้การศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าประชากรที่ติดเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติมีระดับแอนติบอดีต่อ PfMSP1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อ block 2 และต่อส่วน C-terminus ของโปรตีน มีความสัมพันธ์ผกผันกับปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในกระแสโลหิตอย่างมีนัยสำคัญ^{105,112}

สำหรับโปรตีน MSP1 ของ *P.vivax* (PvMSP1) เชื่อว่ามีบทบาทเป็นองค์ประกอบของวัคซีนได้เช่นเดียวกับ PfMSP1 โดยพบว่าลิงที่ได้รับการฉีดวัคซีนที่มีองค์ประกอบของ PvMSP1 สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียดังกล่าวได้^{113,114} ผู้ที่ติดเชื้อ *P.vivax* ในธรรมชาติมีการสร้างแอนติบอดีต่อ PvMSP1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่มีความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนสูง¹¹⁵⁻¹¹⁷ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มีแอนติบอดีต่อส่วน C-terminus ของ PvMSP1 บริเวณที่มีขนาด 42 กิโลดาลตัน (PvMSP142) หรือ 19 กิโลดาลตัน (PvMSP119) มักมีปริมาณการติดเชื้อในกระแสโลหิตต่ำกว่าผู้ที่ไม่มียแอนติบอดีดังกล่าว¹¹⁸ แม้ว่าบทบาทของ PvMSP-1 เกี่ยวกับการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงยังไม่ทราบชัดเจนแต่จากการศึกษาโดยใช้เปปไทด์สังเคราะห์พบว่า PvMSP1 ประกอบด้วย red cell และ reticulocyte binding motifs หลายแห่ง^{119,120}

เนื่องจาก PvMSP1 มีความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนสูงเช่นเดียวกับ PfMSP1 แม้ว่าการศึกษามืออยู่อย่างจำกัดมากกว่า ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน PvMSP1 พบว่ามีความแตกต่างจากยีน PfMSP1 ชัดเจน กล่าวคือ ความหลากหลายในลำดับเบสมีพื้นฐานมาจาก รูปแบบของยีนหรืออัลลีล (allele) มากกว่า 2 แบบในหลายบริเวณทำให้โครงสร้างของยีน PvMSP1 มีลักษณะที่ไม่เป็นระเบียบแบบแผนชัดเจน (mosaic organization) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน PvMSP1 โดยใช้ ตัวอย่างจากหลายภูมิภาคของโลกพบว่าสามารถแบ่งยีน PvMSP1 เป็น 13 block¹²¹ ซึ่งประกอบด้วย conserved block 7 แห่ง และ variable block 6 แห่ง โดยบริเวณ conserved block พบการแทนที่ของเบสใน codon ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนมากกว่าการแทนที่ที่ทำให้กรดอะมิโนคงเดิมเล็กน้อยประมาณร้อยละ 5 ทั้งนี้การแทนที่ดังกล่าวส่วนใหญ่เกิดจากการแทนที่ของเบสเพียง 2 ชนิดในแต่ละตำแหน่ง (dimorphic substitution) กลไกการเกิดความหลากหลายของ PvMSP1 สามารถอธิบายได้จากการเกิด intragenic recombination

2.2 merozoite surface protein 2 (MSP2) เป็น

โปรตีนที่มีส่วนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของ merozoite โดยอาศัย glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor¹²²⁻¹²⁴ ของ *P.falciparum* แต่ไม่พบในเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นที่ก่อโรคในคน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 ถึง 56 กิโลดาลตัน โปรตีนชนิดนี้แม้จะมีขนาดเล็กแต่มีความหลากหลายสูงในรูปแบบของยีน ในลำดับกรดอะมิโนและในคุณสมบัติด้านการเป็นแอนติเจน โครงสร้างของ MSP2 ประกอบด้วยบริเวณ N-terminus และ C-terminus ที่มีความคงที่ของลำดับกรดอะมิโนสูง แต่ในส่วนกลางประกอบด้วย 2 ส่วนย่อย ได้แก่ ส่วนย่อยที่มีลำดับกรดอะมิโนซ้ำกันในลักษณะของ repeats และส่วนย่อยของ non-repeats ซึ่งมีความแตกต่างตามสายพันธุ์ของเชื้อ อย่างไรก็ตาม ความหลากหลายของ MSP2 สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มอัลลีล FC27 และกลุ่มอัลลีล 3D7 โดยกลุ่มอัลลีล FC27 นั้นบริเวณ repeats ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนซ้ำกันเป็นชุด 2 แบบ คือ แบบที่มีกรดอะมิโน 32 ตัวใน repeats เรียงต่อกัน 3 ชุด และตามด้วยแบบที่มีกรดอะมิโน 12 ตัวใน repeats ซ้ำกัน 1 ถึง 5 ชุด สำหรับกลุ่มอัลลีล 3D7 เป็นชนิดที่มีกรดอะมิโนผันแปรสูงทั้งจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนใน repeats โดยกรดอะมิโนที่พบส่วนใหญ่ คือ alanine, glycine และ serine¹²²⁻¹²⁴ นอกจากนี้ยังพบอัลลีลที่มีลักษณะเป็นลูกผสมระหว่างกลุ่มอัลลีล FC27 และกลุ่มอัลลีล 3D7 แต่อัลลีลชนิดนี้พบได้น้อยมากในธรรมชาติ^{125,126} แอนติบอดีต่อ MSP2 สามารถยับยั้งการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดง¹²⁷ และยับยั้งการกระจายตัวของ merozoite จากกระบวนการเกิด cross-link บนผิว merozoite¹²⁸ นอกจากนี้เปปไทด์สังเคราะห์ที่มีลำดับกรดอะมิโนจากบางส่วนของ MSP2 สามารถเกาะติดบนผิวเม็ดเลือดแดงและยับยั้งการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้¹²⁹ การศึกษาในระดับวิทยาในชุมชน Irian Jaya ในประเทศอินโดนีเซียพบว่าแอนติบอดีในผู้ที่ติดเชื้อ *P.falciparum* ส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยากับส่วน repeats ของ Msp-2 ในขณะที่แอนติบอดีต่อบริเวณ N-terminus และ C-terminus มักเกิดขึ้นภายหลังที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อบ่อยครั้งและมีความแปรผันตามอายุของผู้ที่ได้รับเชื้อ¹³⁰⁻¹³²

2.3 merozoite surface protein 3 (MSP3) โปรตีน MSP3 ของ *P.falciparum* (PfMSP3) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย repeats ที่มีกรดอะมิโน 7 ตัวเรียงซ้ำกันเป็นชุด โดยมีกรดอะมิโน alanine ในตำแหน่งที่ 1 และที่ 5 ของ repeats ดังนั้น Msp-3 จึงน่าจะมีโครงสร้างเป็นขดในลักษณะของ coiled-coil alpha-helices^{133,134} สำหรับ MSP3 ของ *P.vivax* (PvMSP3) ประกอบด้วยกลุ่มของโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกัน 3 ชนิด เรียกว่า PvMSP3- α , PvMSP3- β และ PvMSP3- γ ¹³⁵ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลที่มีความแตกต่างกันขนาดประมาณ 75 ถึง 105 กิโลดาลตัน มีโครงสร้างเป็นขด (coil motif) สำหรับศักยภาพของโปรตีนชนิดนี้ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนนั้นเนื่องจากแอนติบอดีต่อ PfMSP3 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้ โดยกระบวนการ antibody-dependent cellular inhibition (ADCI)¹³⁶ กล่าวคือแอนติบอดีไม่ได้ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียโดยตรง แต่แอนติบอดีที่เกิดขึ้นเป็นแอนติบอดีจำพวก cytophilic เช่น IgG1 และ IgG3 ทำหน้าที่จับกับ monocyte และ MSP3 โดยอาศัยส่วนของ Fc receptor เพื่อกระตุ้นการสร้าง cytokines ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียต่อไป^{136,137}

2.4 merozoite surface protein 4 (MSP4) และ merozoite surface protein 5 (MSP5) โปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่พบใน *P.falciparum* (PfMSP4 และ PfMSP5) เป็นโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกัน คือประมาณ 40 กิโลดาลตัน ปรากฏที่ผิวของ merozoite ทางด้าน C-terminus ของโปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วย epidermal growth factor (EGF)-like domain¹³⁸ เช่นเดียวกับที่พบใน MSP1 ทั้งนี้ PfMSP4 และ PfMSP5 เป็นโปรตีนที่มีความหลากหลายต่ำ¹³⁹⁻¹⁴¹ และจากการศึกษาข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าผู้ที่มีแอนติบอดีต่อ PfMSP4 มีความสัมพันธ์กับการพบปริมาณเชื้อในกระแสเลือดน้อยกว่าผู้ที่ไม่ได้มีแอนติบอดีดังกล่าว¹⁴² ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน MSP4 และ MSP5 พบว่า PvMSP4 มีความหลากหลายน้อยกว่า PfMSP4 ในขณะที่ PvMSP5 มีความหลากหลายมากกว่า PfMSP5^{143,144} สำหรับ MSP4 และ MSP5 ของเชื้อ

มาลาเรียของหนูเป็นยีนเดียวกันจึงเรียกว่า MSP4/5 ซึ่งในการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีน MSP4/5 ของ *P.yoelii* เพื่อเป็นวัคซีนในหนูทดลอง พบว่าสามารถกระตุ้นให้หนูเกิดภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกันได้^{142,145} ดังนั้น MSP4 และ MSP5 จึงมีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย

2.5 apical membrane antigen 1 (AMA1) เป็นโปรตีนที่สร้างจาก microneme ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของ apical organelle มีขนาดประมาณ 83 กิโลดาลตัน และปรากฏบนผิวของ merozoite โปรตีนชนิดนี้ถูกสร้างขึ้นตั้งแต่ตอนปลายของระยะ trophozoite จนถึงระยะ schizont โดยในภายหลังจากการสร้างโปรตีนดังกล่าวแล้วไม่นานจะเกิดกระบวนการย่อยให้มีขนาดเล็กลงเหลือ 66 กิโลดาลตัน และถูกขนส่งไปยังผิวของ merozoite โดยกระจายตัวสม่ำเสมอบนเยื่อหุ้ม merozoite นอกจากจะพบ AMA-1 บนผิวของ merozoite โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขณะ que merozoite ลูกกลมเข้าเม็ดเลือดแดงแล้วยังพบได้จนถึงระยะวงแหวนตอนต้นๆ^{146,147} AMA-1 มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการลูกกลมของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดง¹⁴⁸ สำหรับโครงสร้างของ AMA-1 นั้นมีความคล้ายคลึงกันสูงระหว่างเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกัน โดย AMA-1 ของ *P.falciparum* ประกอบด้วย 1) ส่วน N-terminus ที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular domain) มีกรดอะมิโน 546 ตัว 2) บริเวณที่แทรกในเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane domain) มีกรดอะมิโน 21 ตัว และ 3) บริเวณ C-terminus ที่อยู่ในส่วนไซโตพลาสซึม (cytoplasmic domain) มีกรดอะมิโน 55 ตัว ลักษณะสำคัญประการหนึ่งของ AMA-1 คือการมีกรดอะมิโน cysteine 16 ตัวเป็นองค์ประกอบ โดยพบในส่วนของโปรตีนที่อยู่นอกเซลล์ทำให้เกิดการสร้างพันธะ disulfide ภายในโมเลกุลหลายตำแหน่ง ดังนั้น AMA-1 จึงมีโครงสร้าง 3 มิติเป็นลักษณะของ loop ต่าง ๆ เกิดขึ้น¹⁴⁹ ไม่มีกรดอะมิโนที่เรียงซ้ำกันเป็นชุด แต่จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ AMA-1 จากตัวอย่างเชื้อ *P.falciparum* ในธรรมชาติพบการแทนที่ของเบสหลายตำแหน่งในส่วนของโปรตีนที่อยู่นอกเซลล์และบางตำแหน่งตรงกับบริเวณที่เป็น T helper epitopes การแทนที่ส่วนใหญ่ทำให้กรด

อะมิโนเปลี่ยนชนิดไป การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดจากอิทธิพลของการคัดเลือกตามธรรมชาติเช่นเดียวกับที่พบใน T cell epitopes ที่อยู่บริเวณ C-terminus ใน CSP ของ *P.falciparum*^{66,150} สำหรับ AMA-1 ของ *P.vivax* พบว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด และพบว่า การเกิดความหลากหลายในยีนนี้เนื่องจาก intergenic recombination เนื่องจาก AMA-1 ของ *P.knowlesi* ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์เพื่อเป็นวัคซีนในลิงวอกหรือลิง rhesus พบว่าให้ผลการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียดังกล่าวได้^{151,152} หรือการใช้ AMA-1 ของ *Plasmodium fragile* ในรูปของโปรตีน recombinant เป็นวัคซีน พบว่าลิง squirrel สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อได้บางส่วน¹⁵³ และผลทำนองเดียวกันเกิดขึ้นเมื่อใช้ AMA-1 ของเชื้อมาลาเรีย *P.chabaudi* ของหนูทดลอง รวมทั้งพบว่า T cell จากหนูที่ได้รับวัคซีนสามารถถ่ายทอดความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อได้บางส่วนสู่หนูตัวอื่นที่ไม่ได้รับวัคซีน^{154,155} ดังนั้น AMA-1 จึงมีศักยภาพที่ดีในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน

2.6 Glutamate-rich protein (GLURP) เป็นโปรตีนที่พบใน parasitophorous vacuole และพบได้บนผิวของ merozoite ของเชื้อ *P.falciparum* ก่อนลูกกลมเข้าสู่เม็ดเลือดแดงแล้ว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 220 กิโลดาลตัน¹⁵⁶ โดย GLURP มีขนาดแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อ แต่กลับไม่พบความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจน¹⁵⁷ จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีต่อ GLURP ในเด็กที่มีอายุระหว่าง 5 ถึง 9 ปีที่ติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไลบีเรียและแกมเบีย พบว่าผู้ที่มีแอนติบอดีดังกล่าวมักมีปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดต่ำกว่าผู้ที่ไม่มีแอนติบอดีต่อ GLURP¹⁵⁸ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่ติดเชื้อแต่ไม่มีอาการของโรค มักมีระดับแอนติบอดีต่อ GLURP ในระดับสูง¹⁵⁹ แม้ว่าแอนติบอดีต่อส่วน repeats และส่วนที่ไม่มี repeats ของ GLURP ไม่สามารถยับยั้งกระบวนการลูกกลมของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้โดยตรง แต่พบว่าแอนติบอดีดังกล่าวทำหน้าที่ร่วมกับ monocyte ในการยับยั้งการเจริญของ *P.falciparum* โดยกลไกของ

antibody-dependent cellular inhibition เช่นเดียวกับบทบาทของแอนติบอดีต่อ MSP3¹⁶⁰ โดยแอนติบอดีดังกล่าวเป็น cytophilic antibody เช่นเดียวกัน¹³⁸

นอกจากแอนติเจนที่กล่าวมาแล้วนี้ยังมีโปรตีนอื่น ๆ ของเชื้อมาลาเรียที่อาจมีบทบาทในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนอีกหลายชนิด เช่น erythrocyte-binding protein (EBA-175), serine repeat antigen (SERA), ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) และ rhoptry proteins เป็นต้น^{161,162}

3. โปรตีนที่มีศักยภาพเป็นองค์ประกอบของวัคซีนจากระยะที่เจริญโดยอาศัยเพศ (sexual stage vaccine candidates)

การกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของคนสร้างแอนติบอดีต่อระยะ gametocyte ของเชื้อมาลาเรียนั้นสามารถป้องกันการปฏิสนธิของเชื้อในกระเพาะอาหารของยุงก้นปล่อง วัคซีนในกลุ่มนี้ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในผู้ที่ได้รับวัคซีน แต่แอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียสู่ผู้อื่นในชุมชน ในระยะรัศมีที่ยุงก้นปล่องสามารถบินออกหาอาหารได้^{163,164} เป้าหมายของวัคซีนในกลุ่มนี้อาจแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ 1) การทำลายระยะสืบพันธุ์ก่อนที่จะมีการปฏิสนธิ (pre-fertilization) ประกอบด้วย gametocyte และ gamete รวมทั้งกระบวนการเกิด exflagellation ของ gametocyte เพศผู้ แอนติเจนที่สำคัญสำหรับเป้าหมายนี้คือ Pfs230 และ Pfs48/45 ที่พบใน *P.falciparum* 2) การทำลายระยะ zygote และ ookinete หรือเป็นช่วงที่เกิดขึ้นหลังจากการปฏิสนธิ (post-fertilization) เช่น Pfs25 และ Pfs28 ของ *P.falciparum* เป็นต้น และ 3) การทำลาย late-midgut-stage เป็นช่วงที่มีการสร้างเอนไซม์ chitinase ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับ ookinete ที่จะไชผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุงพาหะ รวมทั้งการสร้าง proteinase จากยุงซึ่งจะกระตุ้นการทำงานของ chitinase จากตัวอ่อนของเชื้อมาลาเรีย โปรตีนที่สำคัญและมีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียหรือวัคซีนเพื่อทำลายระยะสืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียมีดังนี้

3.1 Pfs230 โปรตีนชนิดนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายใน 48 ชั่วโมงหลังจากที่มีการสร้าง gametocyte ในเม็ดเลือดแดง มีขนาด 363 กิโลดาลตัน โปรตีนดังกล่าวจะถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลงเหลือ 310 กิโลดาลตัน และสามารถพบได้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของระยะ gamete^{165,166} Pfs230 มีส่วนที่ประกอบด้วย repeats ที่มี glutamine เป็นองค์ประกอบจำนวนมากเรียงซ้ำกันหลายชุด เนื่องจากกรดอะมิโนที่เรียงซ้ำกันเป็นชุดนั้นอยู่ทางด้าน N-terminus ของโปรตีนซึ่งจะถูกย่อยออกไปทำให้โปรตีนส่วนที่เหลือบนผิว gamete มีขนาด 310 กิโลดาลตันซึ่งไม่มีลำดับกรดอะมิโนดังกล่าว นอกจากนี้ Pfs230 ยังประกอบด้วยส่วนของ cysteine motif ที่ประกอบด้วย cysteine จำนวน 7 ตัว พบซ้ำกันมากถึง 6 ชุดซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์¹⁶⁷ แอนติบอดีต่อ Pfs230 สามารถยับยั้งการเจริญของ gametocyte ในยูงพาหะโดยอาศัย complement โดยกลไก antibody-dependent complement-mediated lysis และต้องเกิดขึ้นก่อนที่จะมีการปฏิสนธิของเชื้อมาลาเรียเท่านั้น^{168,169} แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติมักทำปฏิกิริยากับ repeats ใน Pfs230 ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่อยู่บนผิว zygote ดังนั้นจึงไม่มีผลต่อการป้องกันการปฏิสนธิของเชื้อมาลาเรียและส่วนของ repeats นี้ อาจเกี่ยวข้องกับการบวนกรหลบหลีกการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ที่ได้รับเชื้อมาลาเรีย¹⁶⁷

3.2 Pfs48/45 เป็นโปรตีนขนาด 48 และ 45 กิโลดาลตันที่พบบนผิวของ gametocyte, gamete และ zygote ของ *P. falciparum* เรียกว่า Pfs48/45 โดยโปรตีนดังกล่าวมีโครงสร้างคล้ายกันประกอบด้วย 4-cysteine motif และ 6-cysteine motif ทั้งนี้ Pfs48/45 สามารถจับอยู่กับ Pfs230 โดยไม่ได้ใช้พันธะโคเวเลนต์ และแอนติบอดีต่อ Pfs48/45 สามารถยับยั้งกระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อมาลาเรียโดยไม่ต้องอาศัย complement¹⁷⁰ และการจับของแอนติบอดีต่อ epitope หนึ่งจะช่วยให้การจับของแอนติบอดีต่อ epitope อื่นดีขึ้น¹⁷¹ นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวสามารถยับยั้งการสร้าง ookinete ดังนั้น Pfs48/45 จึงน่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาวัคซีน อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ

มีความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนต่ำแต่การแทนที่ของกรดอะมิโนในบาง epitope ของ Pfs48/45 อาจมีผลต่อประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี^{172,173}

3.3 Pfs25 เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างตั้งแต่ระยะ gametocyte ของ *P. falciparum* ในปริมาณเพียงเล็กน้อยและพบมากขึ้นโดยลำดับจนถึงขณะเกิด exflagellation และพบมากที่สุดในระยะ zygote ทั้งนี้ระยะ ookinete และ oocyst สามารถพบโปรตีนดังกล่าวได้เช่นกัน¹⁷⁴ ลักษณะเด่นของ Pfs25 คือมีความหลากหลายต่ำ และมี EGF-like domain 4 แห่ง โดย domain ที่ 2 มีศักยภาพในการกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการปฏิสนธิของเชื้อมาลาเรียในยูงได้ดี¹⁷⁵ เนื่องจาก EGF-like domain มีการสร้างพันธะ disulfide ระหว่างกรดอะมิโน cysteine ดังนั้น B cell epitope ที่พบจึงมีลักษณะเป็น conformational epitope หรือ epitope ที่มีคุณสมบัติขึ้นกับโครงสร้างสามมิติของโปรตีนและบาง epitope อาจเกิดขึ้นจากการที่บริเวณต่างกันถูกม้วนพับเข้ามาจนเกิดความใกล้ชิดกันในลักษณะของ discontinuous epitope¹⁷⁶ แอนติบอดีต่อ Pfs25 พบได้ในผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติและสามารถยับยั้งกระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้¹⁷⁷ นอกจากนี้การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ Pfs25 เป็นวัคซีนในหนูและลิงทดลอง พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มีผลในการยับยั้งขั้นตอนการเจริญของเชื้อมาลาเรียภายหลังการปฏิสนธิแล้ว^{178,179}

3.4 Pfs28 เป็นโปรตีนของ *P. falciparum* ที่สร้างขึ้นบนผิวของระยะ zygote ซึ่งพบหลังจากการสร้าง Pfs25¹⁸⁰ ประกอบด้วยส่วน secretory signal ทางด้าน N-terminus และ GPI anchor ทางด้าน C-terminus โดยส่วนกลางของโปรตีนประกอบด้วย EGF-like domain 4 แห่ง¹⁸⁰ คุณสมบัติสำคัญประการหนึ่งของ Pfs28 คือสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันร่วมกับ Pfs25 ในการสร้างแอนติบอดีที่มีฤทธิ์เสริมกัน¹⁸⁰

นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอื่น ๆ ที่พบในช่วงท้ายของระยะ ookinete และ oocyst ที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน

การหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์

เนื่องจากในช่วงเวลาที่เชื้อมาลาเรียเจริญในร่างกายคนต้องเผชิญกับระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถทำลายหรือเป็นอุปสรรคในการดำรงชีพของเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นเชื้อมาลาเรียจึงมีกลไกที่หลากหลายเพื่อหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของคน ซึ่งการเข้าใจกลไกเหล่านี้จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญของการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

1. ความหลากหลายในรูปแบบแอนติเจน (antigenic diversity) กลไกการเกิดความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ อาจเกิดขึ้นจากกระบวนการที่แตกต่างกันหรือหลายกระบวนการพร้อมกัน ดังนี้

1.1 การแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างรูปแบบของยีน (allele) ที่ต่างกัน (intragenic หรือ interallelic recombination) กระบวนการนี้มักเกิดขึ้นกับยีนสำหรับโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนที่ปรากฏบนผิวเซลล์หรือโปรตีนที่ถูกส่งออกนอกเชื้อมาลาเรีย กลไกดังกล่าวเกิดขึ้นในขณะที่เชื้อมาลาเรียเกิดการปฏิสนธิในกระเพาะอาหารของยุง ส่งผลให้ประชากรเชื้อมาลาเรียในรุ่นถัดไปมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากบรรพบุรุษ ทั้งนี้รูปแบบของแอนติเจนจากยีนหนึ่งๆ จะมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อมาลาเรีย แต่รูปแบบของแอนติเจนที่แสดงออกจะมีเพียงแบบเดียวและมีความคงที่ตลอดอายุขัยของเชื้อมาลาเรีย จนกว่าจะมีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมขณะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในรุ่นถัดไป กระบวนการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือรูปแบบของยีนในแต่ละตำแหน่งของยีน โดยอาศัยหลักการตรวจสอบความเบี่ยงเบนจากหลัก Hardy-Weinberg equilibrium หรือทดสอบโดยการทดลองทำ genetic cross ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียที่มีรูปแบบของยีนที่ต่างกัน¹⁸¹ ความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนดังกล่าวส่งผลให้แอนติบอดีที่เกิดขึ้นต่อแอนติเจนรูปแบบหนึ่งอาจไม่มีผลต่อแอนติเจนรูปแบบอื่นทั้งที่เป็นแอนติเจนชนิดเดียวกัน อันเนื่องจากลำดับกรดอะมิโนในบางส่วนของแอนติเจนที่แตกต่างกันอาจทำให้ epitopes ในแอนติเจน

มีคุณสมบัติแปรเปลี่ยนไป จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับแอนติเจนของเชื้อ *P.falciparum* และ *P.vivax* จากตัวอย่างในประเทศไทยพบว่ามียีนสำหรับแอนติเจนที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนหลายชนิดที่มีลักษณะความหลากหลายด้วยกลไกการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมดังกล่าว เช่น merozoite surface protein-1, merozoite surface protein-2, apical membrane antigen-1 และ merozoite surface protein-5 เป็นต้น^{100,121,140,144,182-184} นอกจากนี้ในส่วนของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงซ้ำกันเป็นชุดๆ หรือ repeats นั้น อาจเกิดกระบวนการเพิ่มหรือลดลงของจำนวนชุดดังกล่าวในระหว่างการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อมาลาเรีย แม้จะเกิดขึ้นอย่างจำกัดในช่วงชีวิตที่เชื้อมาลาเรียเจริญในเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้กลไกทางพันธุกรรมดังกล่าวเกิดจากกระบวนการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมแบบ unequal crossing-over หรือ slipped-strand mispairing ระหว่างส่วนของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุด¹⁸⁵ ตัวอย่างยีนที่ตรวจพบจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากผู้ป่วยโรคมาลาเรียชนิด *P.falciparum* เช่น circumsporozoite protein ส่วนของ block 2 ของ merozoite surface protein-1 และบริเวณส่วนกลางของ merozoite surface protein-2 รวมทั้ง sporozoite threonine-asparagine rich protein^{66,100,183,184,186} และที่พบใน *P.vivax* เช่น merozoite surface protein-1 และส่วนของ repeats ใน merozoite surface protein 4 และ 5 เป็นต้น^{121,143,144,187} ทั้งนี้จำนวนชุดของ repeats ที่แตกต่างกันอาจส่งผลให้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ epitope เหล่านี้ อาจไม่ตอบสนองในกรณีที่มีจำนวนชุดของ repeats ไม่มากพอ หรือมีการแทรกของ repeats รูปแบบอื่นเพิ่มเติมจากเดิม

1.2 แอนติเจนที่มีความผันแปร (antigenic variation) เกิดจากการแสดงออกของยีนในแต่ละระยะเวลาที่ต่างกัน โดยบริเวณ subtelomere ของโครโมโซมของ *P.falciparum* ประกอบด้วยกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกันได้แก่ ยีน var ซึ่งสร้างโปรตีนที่ถูกส่งไปยังเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงเรียกว่า erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) ยีน rif สร้างโปรตีน Rifin (repetitive interspersed family)

ยีน *stevor* สร้าง (subtelomeric variable open reading frame) และยีน *Pfmc-2Tm* สร้างโปรตีน *Pfmc-2Tm* (Maurer's cleft two transmembrane) ยีนเหล่านี้มีหลายชุดโดยแต่ละชุดมักจะสร้างโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายกัน แต่องค์ประกอบและลำดับของกรดอะมิโนในหลายบริเวณมีความแตกต่างกัน ดังนั้นคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนสำหรับโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นแต่ละชุดล้วนมีความแตกต่างกัน ซึ่งในแต่ละนิวเคลียสของเชื้อมาลาเรียประกอบด้วยยีน *var* จำนวนประมาณ 60 ชุด ยีน *rif* 149 ชุด ยีน *stevor* 28 ชุด และยีน *Pfmc-2Tm* 11 ชุด^{186,187} ยีนเหล่านี้ถูกควบคุมอย่างรัดกุมในช่วงที่มีการสร้าง messenger RNA (mRNA) โดยแต่ละยีนจะมีการสร้าง mRNA จากยีนเพียงชุดเดียวในแต่ละระยะของการเจริญของเชื้อมาลาเรีย ทั้งนี้ในระยะวงแหวนจะมีการสร้างโปรตีนจากยีน *var* ในระยะ early หรือ growing trophozoite โปรตีนจะถูกสร้างจากยีน *rif* ส่วนระยะ mature trophozoite นั้น ยีน *stevor* และ *Pfmc-2Tm* ทำหน้าที่สร้างโปรตีน ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะถูกขนส่งจาก Maurer's cleft ไปยังเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายตุ่มขนาดเล็ก (knob-like structure) ในบริเวณดังกล่าว^{188,189}

PfEMP1 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดเรียกว่า cytoadherence ซึ่งทำให้เชื้อมาลาเรียที่เจริญเกินระยะวงแหวนไปแล้ว ซึ่งเจริญอยู่ภายในเม็ดเลือดแดงที่มีผิวเป็นตุ่มขนาดเล็ก สามารถเกาะติดกับผนังหลอดเลือด ดังนั้นเชื้อมาลาเรียระยะดังกล่าวจึงสามารถหลบหนีจากการถูกทำลายโดยม้าม ดังนั้นจึงพบเชื้อมาลาเรียระยะที่เจริญเกินระยะวงแหวนในหลอดเลือดดำขนาดเล็กที่หล่อเลี้ยงอวัยวะภายใน (visceral blood) กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า sequestration สำหรับตัวรับหรือ receptor บนเซลล์ที่บุผนังหลอดเลือดมีหลายชนิด เช่น CD36, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), TSP (thrombospondin), CR1 (complement receptor-1), VCAM1 (vascular adhesion molecule-1) และ CSA (chondroitin sulfate A)¹⁸⁹ นอกจากนี้ PfEMP1 ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิด rosettes คือการที่เม็ดเลือดแดงที่

ไม่มีเชื้อมาลาเรียมาจับรอบๆ ผิวของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียระยะที่มีการเจริญเกินระยะวงแหวนไปแล้ว ซึ่งการจับนี้อาศัย Duffy-binding-like 1 domain หรือ DBL-1¹⁹⁰

สำหรับอัตราการสลับเปลี่ยน (switch) เพื่อการสร้างโปรตีน PfEMP1 ที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากเดิมเกิดขึ้นด้วยอัตราประมาณ 10^{-2} ต่อช่วงอายุที่เชื้อมาลาเรียเจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงครบ 1 รอบ การเกิดรูปแบบแอนติเจนใหม่ที่ต่างจากเดิมจึงไม่มีความคงที่ในช่วงชีวิตที่เชื้อมาลาเรียแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศ การเปลี่ยนรูปแบบแอนติเจนใหม่ในครั้งแรกจะเกิดเพียงบางเซลล์แล้วจะมีการเพิ่มปริมาณอย่างมาก ภายหลังจากการแบ่งตัวของเชื้อมาลาเรียรุ่นใหม่โดยเชื้อมาลาเรียที่มีแอนติเจนแบบเดิมอาจถูกทำลายไปโดยระบบภูมิคุ้มกันของคน ในขณะที่เชื้อที่มีแอนติเจนแบบใหม่สามารถดำรงชีพอยู่ได้จนกว่าโฮสต์สามารถสร้างแอนติบอดีมาทำลายเชื้อรุ่นใหม่เหล่านี้ ซึ่งในขณะเดียวกันจะมีเชื้อมาลาเรียบางเซลล์เกิดการสลับเปลี่ยนแอนติเจนในรูปแบบที่ใหม่กว่าเดิมที่สามารถหลบหนีการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในขณะนั้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะดำเนินต่อไปอย่างเป็นลำดับต่อเนื่อง¹⁹¹ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนรูปแบบแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงของเชื้อมาลาเรียย่อมสามารถส่งผลบวกและผลลบในขณะเดียวกันต่อทั้งตัวเชื้อมาลาเรียและต่อโฮสต์ กล่าวคือ PfEMP1 ที่เปลี่ยนรูปแบบไปอาจทำให้ความแข็งแรงในการจับกันระหว่าง knob บนผิวเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียเจริญอยู่ภายในกับผนังหลอดเลือดเปลี่ยนแปลงไปอันอาจเป็นผลเสียต่อเชื้อมาลาเรีย หรืออาจมีผลต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อมาลาเรียให้ทวีความรุนแรงขึ้นจนโฮสต์เสียชีวิตพร้อมกับเชื้อมาลาเรียในที่สุด ในทางตรงข้ามการสลับเปลี่ยนแอนติเจนอย่างต่อเนื่องสามารถส่งเสริมให้เกิดภาวะการติดเชื่อที่เรื้อรังพร้อมกับพัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ที่สามารถควบคุมปริมาณของเชื้อและความรุนแรงของโรคมาลาเรียได้ในที่สุดจนเกิดภาวะภูมิคุ้มกันต่ออาการของโรคมาลาเรียหรือภาวะที่มี clinical immunity แม้จะมีเชื้ออยู่ในร่างกาย ในขณะเดียวกันภาวะดังกล่าวย่อมส่งผลดีต่อเชื้อมาลาเรียให้มีโอกาสพัฒนาเป็น

ระยะ gametocyte ได้มากขึ้นทำให้เกิดการแพร่เชื้อสู่ ยุงก้นปล่องพาหะได้ต่อไป¹⁹²⁻¹⁹⁴

ในกรณีของการติดเชื้อมาลาเรียขณะตั้งครรรภ์ พบว่าจะมีการสร้างโปรตีนจากยีน *var* ที่มีลักษณะพิเศษ เรียกว่า *var2csa* ซึ่งมีคุณสมบัติจับกับตัวรับ chondroitin sulfate A อย่างจำเพาะโดยไม่จับกับตัวรับอื่นๆ บนผิวของ syncytiotrophoblasts ที่อยู่ในรก ซึ่งมีผลต่อการ เจริญของทารกในครรภ์ ทั้งนี้โปรตีน *var2csa* ดังกล่าวจะไม่พบว่ามี การสร้างโดยเชื้อมาลาเรียที่เจริญในระบบไหลเวียนของผู้ติดเชื้อเพศชายและเด็ก จากการศึกษาต่อมา พบว่าภายหลังจากการตั้งครรรภ์หลายครั้ง หญิงตั้งครรรภ์ ดังกล่าวสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ *var2csa* ทำให้ความรุนแรงและผลกระทบต่อสุขภาพของทารกในครรภ์จากการ ติดเชื้อมาลาเรียของมารดาขณะตั้งครรรภ์ลดลงอย่างมาก¹⁹⁵

สำหรับระยะ gametocyte ซึ่งต้องเผชิญกับ ภูมิคุ้มกันในระบบไหลเวียนเช่นกันนั้น พบว่าระยะดังกล่าว สามารถสร้างโปรตีนจากยีน *var*, *rif* และ *stevor* โดยเกิดการผันแปรในรูปแบบของแอนติเจนได้เช่นเดียวกับระยะ ที่เจริญในเม็ดเลือดแดงแบบไม่อาศัยเพศ ในขณะเดียวกัน เชื้อมาลาเรียที่เจริญแบบอาศัยเพศในยุงนั้น ในขณะเกิดการปฏิสนธิ นั้น ยีน PfEMP1 ชุดต่างๆ สามารถเกิดการ แลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมระหว่างยีนแต่ละชุดที่ต่างกัน ได้ ส่งผลให้โครงสร้างของยีน PfEMP1 มีความแตกต่าง จากประชากรรุ่นเดิม อันเป็นการส่งเสริมให้เกิดความ หลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนในประชากรของเชื้อ มาลาเรียเพิ่มมากขึ้น¹⁹⁶

2. การลุกลามของเชื้อมาลาเรียเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเกิดขึ้นได้หลายช่องทาง การลุกลามของระยะ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงอาศัยโปรตีนหลายชนิดที่ สร้างจาก apical organelles ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่ย่อย ผิวเม็ดเลือดแดงโดยไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก นอกจากนี้ ยังมีโปรตีนอื่นอีกหลายชนิดที่ถูกสร้างขึ้นในระยะนี้ เช่น merozoite surface protein-1 มีบทบาทในกระบวนการ เริ่มต้นของการจับกันระหว่าง merozoite และผิวเม็ดเลือดแดง ส่วน apical membrane antigen 1 ทำให้เกิดการ หมุนกลับ (re-orientation) ของ merozoite เพื่อให้ส่วน

apex สัมผัสกับผิวเม็ดเลือดแดง ในขณะที่ erythrocyte binding ligands (EBLs) และ reticulocyte binding protein homologs (RBLs หรือ PfRh) ทำให้เกิด tight junction ระหว่าง apical organelles กับผิวเม็ดเลือดแดง¹⁹⁷ ซึ่ง โปรตีน EBLs ถูกสร้างจากยีนอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ EBA175, EBA140/BAEBL และ EBA181/JE SEBL ซึ่งโปรตีน EBLs สามารถจับกับ glycoproteins ที่มีกรด sialic เป็นองค์ประกอบที่อยู่บนผิวของเม็ดเลือดแดง เช่น glycophorin A และ C รวมทั้งโปรตีน sialic acid band 4.1 ในขณะที่โปรตีน RBLs ถูกสร้างจากยีน 4 ชนิด ได้แก่ PfRh1, PfRh2a, PfRh2b และ PfRh4 โดยทั่วไป merozoite ของ *P. falciparum* จะลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงโดยอาศัยช่องทางที่อาศัยตัวรับบนผิวเม็ดเลือดแดงที่มีกรด sialic เป็นองค์ประกอบ (sialic-acid-dependent pathway) ซึ่งต้องอาศัยโปรตีน EBAs และ PfRh1 ทำหน้าที่เป็นตัวจับ แอนติบอดีต่อโปรตีนเหล่านี้สามารถยับยั้ง การลุกลามของเมอร์โรซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ อย่างไรก็ตามเมื่อโฮสต์มีการสร้างแอนติบอดีดังกล่าว เชื้อมาลาเรีย จะเปลี่ยนไปใช้ช่องทางอื่นที่อาศัยตัวรับที่ไม่มีกรด sialic เป็นองค์ประกอบ (sialic-acid-independent pathway) ซึ่งตัวจับบนผิว merozoite ที่เกี่ยวข้องได้แก่ PfRh2a และ PfRh4 ซึ่งกลไกเหล่านี้ อาจส่งผลให้เกิดการควบคุมปริมาณ เชื้อในโฮสต์และอาจลดระดับความรุนแรงของโรคซึ่งมีผลดี ต่อเชื้อมาลาเรียเนื่องจากปริมาณเชื้อที่น้อยย่อมลดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ส่งผลให้ระยะ gametocyte ซึ่งต้องใช้เวลา 1-2 สัปดาห์ เพื่อการพัฒนาที่สมบูรณ์ให้มี โอกาสรอดเพื่อถ่ายทอดเชื้อสู่ยุงพาหะต่อไป¹⁹⁸⁻²⁰⁰

3. epitopes ที่ซ่อนเร้น (cryptic epitopes) การ มี epitope ที่ซ่อนเร้นในแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียย่อม ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ไม่ตอบสนองต่อ epitope เหล่านี้ ซึ่งถ้าแอนติบอดีต่อ epitope เหล่านี้สามารถ ทำลายเชื้อได้ การซ่อนเร้นดังกล่าวย่อมเป็นผลดีต่อเชื้อ มาลาเรีย ข้อเสนอแนะว่าแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียมี epitope ที่ซ่อนเร้นนั้นจากการศึกษาในหนูทดลองที่ถูก กระตุ้นด้วยระยะ sporozoite ของ *P. yoelii* ที่ผ่านการ ฉายรังสีเอกซ์ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวทำให้แอนติเจนของ

เชื้อมาลาเรียเปลี่ยนโครงสร้างไป ทำให้โฮสต์สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองโดยมี CD8+ T lymphocyte ที่จำเพาะต่อ CSP ที่สามารถกำจัดเชื้อมาลาเรียได้ ในขณะที่ sporozoite ที่ไม่ผ่านการฉายรังสีไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันดังกล่าวเลย ต่อมาภายหลังพบว่าแอนติเจนที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนหลายชนิดมี epitope ที่ซ่อนเร้น เช่น MSP1, CSP และ AMA1 เป็นต้น โดยพบว่าการกระตุ้น T lymphocyte ด้วย epitopes ที่หลบซ่อนเหล่านี้ทำให้เกิดการกระตุ้น B lymphocyte ที่ตอบสนองต่อ epitopes ในแอนติเจนเดียวกัน อันทำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียที่มีคุณภาพ โดยทั่วไปโปรตีนบริเวณที่มีพันธะ disulfide หลายแห่งมักเป็นที่อยู่ของ epitopes ที่ซ่อนเร้น เช่น MSP2, CSP, AMA1 และ TRAP เป็นต้น^{155,201-203}

4. T cell mimotopes หรือ altered peptide ligands (APLs) เนื่องจากการกระตุ้น T cell ต้องอาศัยปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวรับของ T cell (T cell receptor, TCR) กับ MHC-peptide complexes ที่ถูกนำเสนอผ่าน antigen presenting cells (APCs) ผ่านกระบวนการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ จนในที่สุดจึงเกิดการกระตุ้น T cell ทั้งนี้ความแข็งแรงในการจับ (affinity) ระหว่าง TCR และ MHC-peptide complexes ปริมาณการเกิด TCR cross-linking รวมทั้งสารอื่นๆ ที่ถูกกระตุ้นและปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ ล้วนเป็นผลจากการกระตุ้น T cell ดังกล่าว โดยตัวจับที่เป็น TCR agonist จะกระตุ้น T cells ในขณะที่ตัวจับชนิด TCR partial agonist รวมทั้งตัวจับที่เป็น TCR antagonist อาจมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบต่างไปเพียง 1 หรือ 2 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถทำให้การกระตุ้น T cell ลดระดับลง หรือไม่มีการกระตุ้นเลยหรือเปลี่ยนทิศทางการตอบสนองของ CD4+ T cell จาก Th1 ซึ่งเป็น pro-inflammatory เป็น Th2 ซึ่งเป็น anti-inflammatory สำหรับแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียที่พบปรากฏการณ์ดังกล่าวจากคุณสมบัติความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนที่พบได้ใน *P.falciparum* ได้แก่ MSP1 ซึ่งพบว่าอัลลีลที่ต่างกันจะยับยั้งการเพิ่มปริมาณของ T cell ที่จำเพาะต่อแอนติเจนต่างรูปแบบกัน หรือในกรณีของ CSP

พบว่า T cell epitopes ที่หลากหลายในโปรตีนนี้มีผลให้ T cell ตอบสนองในรูปแบบที่มีการสร้าง interleukin-10 (IL-10) ซึ่งมีฤทธิ์ในการตอบสนองแบบ anti-inflammatory ดังนั้นเชื้อมาลาเรียจึงไม่ถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์^{204,205}

5. เชื้อมาลาเรียมีผลต่อ dendritic cells พบว่า *P.falciparum* ระยะที่เจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงและ malarial pigment หรือ hemozoin สามารถยับยั้ง maturation ของ dendritic cell และทำให้ไม่มีการตอบสนองของ T cell ในหลอดทดลอง ทั้งนี้ผลของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงต่อ dendritic cell ยังขึ้นกับความหนาแน่นของเชื้อในกระแสเลือด กล่าวคือถ้ามีสัดส่วนของจำนวนเชื้อในกระแสเลือดต่อปริมาณ dendritic cell ต่ำ จะมีผลให้เกิด maturation ของ dendritic cell ในทางตรงข้ามถ้าสัดส่วนนี้มีค่าสูงขึ้นไปจะมีผลยับยั้งกระบวนการดังกล่าวจนอาจเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของ dendritic cell นอกจากนี้ยังพบว่า merozoite ของเชื้อมาลาเรียมีผลยับยั้ง maturation ของ dendritic cell ได้โดยตรง²⁰⁶⁻²⁰⁸

6. เชื้อมาลาเรียมีผลต่อ regulatory CD4+CD25+ Foxp3+ T cell (Treg) ซึ่ง Treg มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิด self-tolerance และควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อต่างๆ²⁰⁹ แม้ว่า Treg จะมีการพัฒนาในต่อม thymus ก่อนการเดินทางมายังกระแสเลือด แต่ Treg ยังสามารถพัฒนาได้นอกต่อม thymus จากการกระตุ้นของแอนติเจนที่มีปริมาณต่ำร่วมกับการมี transforming growth factor beta (TGF-β) ซึ่ง Treg ทำหน้าที่ยับยั้ง Th1, Th2 และ Th17 cells นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อ *P.falciparum* ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ Treg และ TGF-β ในกระแสเลือด²¹⁰ ในขณะที่การติดเชื้อ *P.vivax* พบว่านอกจากจะมีการเพิ่มขึ้นของ Treg แล้วยังมีการเพิ่มขึ้นของ IL-10 ในกระแสเลือดเช่นกัน²¹¹ ซึ่งการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองโดยมีการเพิ่มขึ้นของ Treg ย่อมเป็นกระบวนการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของเชื้อมาลาเรียซึ่งได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน

แนวทางการแสวงหาวัคซีนป้องกันมาลาเรีย

1. การพัฒนาวัคซีนวิธีเดิม (traditional vaccinology)

นับตั้งแต่แพทย์ Edward Jenner ใช้ไวรัส แวกซิเนีย (vaccinia virus) เป็นวัคซีนป้องกันไข้ทรพิษ (smallpox) ในปี ค.ศ. 1796 หลังจากนั้นแพทย์ Louis Pasteur ได้ใช้แนวทางเดียวกันเพื่อพัฒนาวัคซีนซึ่งต้องประกอบด้วยสารที่ก่อโรครให้ตายแล้วหรือทำให้เชื้ออ่อนกำลังจนไม่สามารถก่อโรคได้หรือทำให้เชื้อตายโดยยังคงสภาพที่ดี แล้วจึงใช้เป็นวัคซีนวิธีดังกล่าวสามารถพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคโปลิโอ โรคหัด โรคคางทูม และโรคหัดเยอรมันได้อย่างประสบความสำเร็จ ซึ่งต่อมาได้มีการใช้องค์ประกอบของตัวเชื้อแล้วทำให้ปราศจากฤทธิ์ข้างเคียงไม่พึงประสงค์ก่อนนำไปใช้เป็นวัคซีนที่ประสบความสำเร็จโดยวิธีนี้เช่น วัคซีนป้องกันโรคคอตีบและโรคบาดทะยัก เป็นต้น²¹² ในระยะต่อมาได้มีการใช้เทคโนโลยีผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) รวมทั้งการพัฒนา สารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) ทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนต่าง ๆ ได้รับการพัฒนามากขึ้นโดยลำดับ²¹³ ซึ่งในกรณีของการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียนั้นได้ใช้แนวทางเดียวกันโดยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลองก่อนการทดลองในคน อย่างไรก็ตามการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียมีความซับซ้อนมากกว่าวัคซีนสำหรับป้องกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรียหรือไวรัสอย่างชัดเจน

การพัฒนาวัคซีนวิธีเดิมนั้นมักต้องใช้เวลาดำเนินการมากและมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก การตรวจหาแอนติเจนเพื่อเป็นองค์ประกอบของวัคซีนทำได้อย่างจำกัด ทั้งนี้แอนติเจนที่นำมาใช้มักได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ซึ่งแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีมักมีคุณสมบัติความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนหรือบางส่วนของแอนติเจนอาจมีคุณลักษณะคล้ายแอนติเจนของคนซึ่งอาจกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อของผู้ที่ได้รับวัคซีน (autoimmunity) รวมทั้งการเลือกใช้แอนติเจนที่มีส่วนของ T cell epitope รวมอยู่ด้วยมักมีข้อจำกัด

2. การพัฒนาวัคซีนย้อนกลับ (reverse vac-

cinology)

เป็นการอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน genome ของจุลชีพในการตรวจสอบย้อนกลับเพื่อหาโปรตีนหรือแอนติเจนที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้²¹⁴

2.1 การใช้คอมพิวเตอร์วิเคราะห์ว่าใน genome มียีนใดบ้างที่น่าจะสร้างโปรตีนที่เป็นแอนติเจน โดยโปรตีนดังกล่าวต้องไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนของคน ซึ่งยีนที่ถูกคัดเลือกในขั้นตอนนี้สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและสามารถคัดเลือกยีนที่เหมาะสมได้เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังสามารถเลือกใช้โปรแกรมพยากรณ์ส่วนของยีนที่น่าจะสร้างเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็น CD4+ T cell epitopes และ CD8+ T cell epitopes ตาม HLA haplotype ต่างๆ

2.2 การใช้เทคโนโลยีผลิตโปรตีนลูกผสม หรือ recombinant peptide หรือเทคโนโลยีอื่น เพื่อการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยอาศัยการพัฒนาวิธีตรวจสอบต่างๆ เช่น การใช้ tetrameric staining repeats เพื่อวัดปริมาณและคุณภาพของ T cells ต่างๆ การวิเคราะห์โดยใช้ ELISPOT และ intracellular cytokine staining (ICCS) เป็นต้น ทำให้เอื้อต่อการตรวจหาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immune response) ได้อย่างรวดเร็วและในปริมาณมากกว่าในอดีต ในขณะที่เดียวกันการตรวจหา B cell epitope ย่อมสามารถทำได้อย่างรวดเร็วกว่าในอดีตเช่นกัน

2.3 เมื่อทำการคัดเลือกแอนติเจนที่มีคุณสมบัติตามต้องการแล้ว จึงนำไปผลิตในรูปแบบที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นวัคซีนสำหรับสัตว์ทดลอง เพื่อตรวจสอบว่าแอนติบอดีสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อได้จริง

2.4 ตรวจสอบว่าแอนติเจนที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนที่ได้ผลิตในสัตว์ทดลองนั้น มีความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนในประชากรของเชื้อก่อโรคที่พบในธรรมชาติหรือไม่ ดังนั้นขั้นตอนนี้จึงเป็นการศึกษาในเชิงระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล (molecular epidemiology) ซึ่งถ้ายีนใดมีความหลากหลายสูงย่อมไม่เหมาะสมในการเลือกใช้เป็นแอนติเจน

2.5 ภายหลังจากการตรวจสอบทางระบาดวิทยาแล้ว

จึงทำการผลิตแอนติเจนให้มีคุณภาพเหมาะสมเพื่อใช้ทดสอบในอาสาสมัคร เพื่อการตรวจสอบความสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของคน ความปลอดภัย และประสิทธิภาพของวัคซีนตามกระบวนการและขั้นตอนการทดสอบวัคซีนในอาสาสมัครตั้งแต่ phase I, II และ III

2.6 ดำเนินการตรวจสอบยืนยันเพื่อการรับรองจากองค์กรที่เกี่ยวข้องเพื่อขอรับการอนุมัติให้ใช้เป็นวัคซีนในคน

2.7 พิจารณาว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นควรใช้ในภาวะหรือภายใต้เงื่อนไขใด เพื่อการป้องกันโรคติดเชื้อ

2.8 ทำการผลิตวัคซีนในเชิงธุรกิจเพื่อใช้กับประชากรทั่วไป พร้อมกับการตรวจสอบขั้นสุดท้าย หรือ phase IV ต่อไป

องค์ความรู้เกี่ยวกับวิวัฒนาการระดับโมเลกุล (molecular evolution) และพันธุกรรมประชากรของเชื้อก่อโรค (population genetics) ยังมีประโยชน์ในการช่วยพัฒนาวัคซีน ทั้งนี้เนื่องจากยีนที่สร้างโปรตีนมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่มีผลในการทำลายหรือมีผลต่อสมรรถนะการมีชีวิตของเชือนั้นมักอยู่ภายใต้อิทธิพลของการคัดเลือกในเชิงบวก (positive selection) ดังนั้นในทางกลับกันถ้าสามารถตรวจสอบว่ายีนของเชื้อก่อโรคชนิดใด และบริเวณใดของยีนอยู่ภายใต้อิทธิพลของกระบวนการดังกล่าว ผลผลิตโปรตีนหรือแอนติเจนจากยีนหรือส่วนของยีนนั้นย่อมน่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นองค์ประกอบของวัคซีน²¹⁵ สำหรับตรวจสอบว่ายีนใดหรือส่วนของยีนอยู่ภายใต้อิทธิพลของกระบวนการคัดเลือกในเชิงบวกอาศัยการคำนวณการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในยีนว่ามีการเบี่ยงเบนไปจากวิวัฒนาการที่เป็นกลาง (neutral evolution) อย่างมีนัยสำคัญในเชิงบวกหรือตามเงื่อนไขที่กำหนดหรือไม่ ซึ่งการทดสอบมีหลายวิธี เช่น

1. การเปรียบเทียบอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดต่อตำแหน่ง (dN) ต่ออัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดต่อตำแหน่ง (dS) ถ้า dN/dS มีค่า

มากกว่า 1 อย่างมีนัยสำคัญแสดงว่ามีร่องรอยของการคัดเลือกในเชิงบวก²¹⁶ เช่น การพบว่ายีน CSP ของ *P.falciparum* บริเวณด้าน 3' ของยีนมีค่า dN/dS มากกว่า 1 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีความสอดคล้องกับตำแหน่งของ CD4+ T cell epitopes (Th2R และ Th3R epitopes) และ CD8+ T cell epitopes²¹⁷ นอกจากนี้การวิเคราะห์ยีนสำหรับแอนติเจนอื่น ๆ พบร่องรอยของการคัดเลือกในเชิงบวกในหลายยีนของ *P.falciparum* เช่น STARP, PfMSP4, PfMSP5, PfAMA1 และ PfTRAP เป็นต้น^{87,140,182,186} ส่วนในกรณีของ *P.vivax* เช่น PvMSP4, PvMSP5 และ PvTRAP เป็นต้น^{89,143,144} ซึ่งผลเหล่านี้ยังสอดคล้องกับการทำนาย epitopes โดยอาศัยองค์ประกอบและคุณสมบัติการเป็น epitopes สำหรับแต่ละ HLA haplotype เช่นในกรณีของ PfMSP5 และ PvMSP5 เป็นต้น

2. McDonald-Kreitman (MK) test เป็นการเปรียบเทียบความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด (synonymous polymorphism) กับความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด (nonsynonymous polymorphism) ภายในยีนจาก species เดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่มีความคงที่ (fixed difference) ระหว่าง species ที่มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน ถ้า MK test มีค่าแตกต่างจากค่าดัชนีเป็นกลาง (neutrality index) อย่างมีนัยสำคัญแสดงว่ายีนหรือส่วนของยีนที่ทดสอบอยู่ภายใต้อิทธิพลของการคัดเลือกในเชิงบวก²¹⁸ ซึ่งน่าจะเป็นบริเวณที่อยู่ภายใต้แรงกดดันจากกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติหรือมี epitope ที่สำคัญเป็นองค์ประกอบตัวอย่างยีนที่ให้ผลการทดสอบ โดย MK test ว่าอยู่ภายใต้อิทธิพลดังกล่าว เช่น PvMSP5 เป็นต้น สำหรับการทดสอบอื่นที่อาศัยหลักการคล้ายกันนี้คือ Hudson-Kreitman-Aguade test เป็นต้น²¹⁹

3. Tajima Test เป็นการคำนวณโดยอาศัยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละคู่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันที่ได้จากแต่ละหน่วยของประชากรกับตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการแทนที่ของนิว

คลัสเตอร์ด้วยความถี่มากกว่า 1 หรือเรียกว่า segregating site ค่าที่คำนวณได้เรียกว่า Tajima's D ซึ่งถ้าค่า D มีค่าไม่ต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญแสดงว่ายีนที่ทดสอบมีวิวัฒนาการแบบเป็นกลาง ถ้าค่า D น้อยกว่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญแสดงว่ายีนที่ทดสอบอยู่ภายใต้อิทธิพลของ directional selection หรือมีการคัดเลือกในเชิงลบ ซึ่งมักพบในยีนที่มีหน้าที่สร้างโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของเซลล์หรือสร้างเอนไซม์ในกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ ในทางตรงข้ามถ้าค่า Tajima's D มีค่ามากกว่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญแสดงว่ายีนดังกล่าวอยู่ภายใต้อิทธิพลของการคัดเลือกในเชิงบวกหรือ balancing selection²²⁰ ซึ่งยีนของเชื้อมาลาเรียที่ตรวจพบว่าให้ค่า Tajima's D มากกว่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ เช่น PfMSP3 และ PfAMA1 ในส่วนที่เป็น extracellular domain เป็นต้น^{221,222} นอกจากนี้ยังมีค่าอื่นๆ ที่ช่วยตรวจสอบสภาวะ balancing selection รวมทั้งการคัดเลือกในเชิงบวก อื่นๆ เช่น Fu and Li's tests ซึ่งอาศัยหลักการคล้าย Tajima test แต่การเปรียบเทียบอาศัยสมการความสัมพันธ์ที่แตกต่างกัน²²³

4. Wright's F_{st} หรือ F statistics เป็นการคำนวณค่า fixation index โดยเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ระหว่างประชากรตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งสามารถคำนวณได้โดยพิจารณาในแต่ละตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่มีความหลากหลาย ค่าที่คำนวณได้เรียกว่า F_{st} ถ้าค่า F_{st} มีค่าต่ำมากหรือเข้าใกล้ศูนย์ แสดงว่ายีนหรือส่วนของยีนนั้นอยู่ภายใต้อิทธิพลของ balancing selection²²⁴ ซึ่งการคำนวณค่า F_{st} สามารถใช้ตรวจสอบส่วนของยีน PfMSP1 ที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของ balancing selection และสามารถตรวจสอบในภายหลังถึงความถูกต้องในการทำนายนี้ จากข้อมูลทางอิมมูโนวิทยาของกลุ่มประชากรและข้อมูลจากการทดลองได้อย่างสอดคล้องกัน ซึ่งการใช้การทดสอบอื่นๆ ไม่พบว่า PfMSP1 อยู่ภายใต้อิทธิพลของการคัดเลือกใดๆ ในทางตรงข้ามค่า Wright's F_{st} อาจไม่เหมาะสมในการตรวจสอบความเบี่ยงเบนจากวิวัฒนาการที่เป็นกลางสำหรับยีนอื่น²²⁵ ดังนั้นการเข้าใจวิวัฒนาการของแต่ละยีน การทราบลักษณะการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งการเลือกตัวอย่างประชากร

ในการวิเคราะห์จึงมีความสำคัญในการเลือกใช้การทดสอบที่เหมาะสม

ข้อดีของ reverse vaccinology เมื่อเปรียบเทียบกับการพัฒนาวัคซีนวิธีเดิมมีหลายประการ กล่าวคือ สามารถตรวจหาแอนติเจนที่มีศักยภาพเป็นวัคซีนได้หลากหลายกว่าวิธีเดิม พร้อมทั้งสามารถตรวจหา T cell epitopes ได้หลายตำแหน่งเพื่อเป็นองค์ประกอบของวัคซีน นอกจากนี้ยังสามารถเลือกแอนติเจนที่ไม่มีความหลากหลายหรือแอนติเจนที่มีความหลากหลายน้อยเพื่อใช้เป็นวัคซีน ตลอดจนระยะเวลาที่ช่วยลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการพัฒนาวัคซีนวิธีเดิม อย่างไรก็ตามในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียโดยอาศัย reverse vaccinology ยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ขั้นตอนการผลิตโปรตีนเพื่อเป็นแอนติเจนยังมีข้อจำกัดในเชิงประสิทธิภาพ และคุณภาพ เนื่องจาก genome ของเชื้อมาลาเรียมีองค์ประกอบของเบส adenine และ thymine ที่สูงมาก ทำให้การเลือกใช้ codon สำหรับการสร้างกรดอะมิโน (codon usage) มีความแตกต่างจากจุลชีพ (เช่น แบคทีเรีย) ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสม เป็นต้น อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีการสร้างโปรตีนจากยีนโดยไม่ต้องอาศัยการสร้างในเซลล์ (cell-free expression) ถ้าได้รับการพัฒนามากขึ้น ในอนาคตอาจช่วยลดข้อจำกัดดังกล่าวได้^{214,226}

สารเสริมฤทธิ์ (Adjuvants)

ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลให้วัคซีนมีประสิทธิภาพดีเพียงใด คือการเลือกใช้ adjuvant ที่เหมาะสม คุณสมบัติของ adjuvant ที่ดีต้องสามารถช่วยเสริมฤทธิ์ (potency) ของแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีน หรือช่วยให้แอนติเจนทำหน้าที่ได้เต็มที่เพื่อให้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้มีการตอบสนองในทิศทางที่ต้องการเพื่อกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ และภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นสามารถอยู่ได้นานโดยไม่ต้องอาศัยการกระตุ้นซ้ำโดยวิธีอื่นๆ นอกจากนี้ adjuvant ที่ดีต้องไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงใดๆ หรือมีผลข้างเคียงที่น้อยมาก นอกจากการเลือกใช้ adjuvant

ให้เหมาะสมตามวัตถุประสงค์แล้ว ต้องพิจารณาถึงองค์ประกอบของ adjuvant ในด้านคุณลักษณะทางกายภาพ เช่น colloid หรือ emulsion เป็นต้น ซึ่งจะมีผลต่อการกระจายในร่างกายรวมทั้งขนาดของสารที่เป็น adjuvant คุณสมบัติการละลายในส่วนของไขมันหรือส่วนของน้ำ ปฏิสัมพันธ์กับแอนติเจน และการคงสภาพของ adjuvant ในภาวะต่างๆ โดยทั่วไป adjuvant สามารถจำแนกเป็น 2 ประเภท ได้แก่²²⁷

1. adjuvant ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) เช่น ตัวจับหรือ ligand สำหรับ Toll-like receptor (TLR), saponin, cytokine ต่างๆ รวมทั้ง exotoxin ของแบคทีเรีย เป็นต้น สารเหล่านี้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้โดยตรง เพื่อเพิ่มการตอบสนองต่อแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีน

2. adjuvant ที่ทำหน้าที่เป็นตัวนำหรือตัวขนส่ง (vehicle) แอนติเจนรวมทั้งสารอื่นที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีน เป็น adjuvant ที่ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนหรือ adjuvant อื่นต่อระบบภูมิคุ้มกันอย่างเหมาะสม สารที่เป็น adjuvant ประเภทนี้ เช่น mineral salts, emulsion, virosomes, liposomes รวมทั้ง microspheres ซึ่งเป็น polymer ที่ย่อยสลายได้ เป็นต้น

อย่างไรก็ตามแม้ว่า adjuvant จะมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของวัคซีน แต่มีวัคซีนบางประเภทที่ไม่จำเป็นต้องอาศัย adjuvant เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ วัคซีนที่ใช้ตัวเชื้อที่ถูกทำให้ความสามารถในการก่อโรคลดลง (attenuated) หรือทำให้หมดคุณสมบัติในการก่อโรค (inactivated) เป็นองค์ประกอบของวัคซีน

ในการเลือกใช้ adjuvant จำเป็นต้องพิจารณาถึงรายละเอียดและผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้น เช่น unmethylated deoxy-cytidyl-deoxyguanosine (CpGs) ให้ผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในคนและในสัตว์ทดลองแตกต่างกัน ทั้งนี้ อาจเนื่องจากความแตกต่างของตัวรับ TLR9 มีความแตกต่างกันระหว่าง species และตัวรับ TLR9 ของเซลล์ต่างชนิดใน species เดียวกันยังมีความแตกต่างกัน ดังนั้น ผลของ adjuvant ดังกล่าวในสัตว์ทดลองจึงไม่ได้บ่งบอก

ถึงผลข้างเคียงที่พึงจะมีขึ้นเมื่อนำมาใช้ในคน หนึ่งตัวจับสำหรับ TLR อาจชักนำให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านเนื้อเยื่อของตัวเอง (autoimmune responses) รวมทั้งพบว่า adjuvant บางชนิด เช่น Montanide ISA-720 ซึ่งเป็น water-in-oil emulsion อาจทำให้เกิด sterile abscess ในบริเวณที่ฉีดวัคซีน^{228,229} นอกจากนี้ยังพบว่าการผสมสารบางอย่างจะช่วยให้ adjuvant คงสภาพดีขึ้น เช่น saponin (QS21) มีความไม่เสถียรและทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะที่อันไม่พึงประสงค์ แต่เมื่อผสมกับ oil-in-water หรือ liposome ซึ่งเป็นสูตรผสมของ adjuvant ในกลุ่ม AS01 และ AS02 จะมีความเสถียรมากขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้น เป็นที่น่าสังเกตว่าแอนติเจนชนิดเดียวกันเมื่อใช้ adjuvant ต่างชนิดกันจะทำให้ผลการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่างกัน เช่น แอนติเจน RTS,S ที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย เมื่อใช้ Alum ผสมกับ monophosphosyl lipid A (AS04) หรือ Alum ผสมกับ oil-in-water emulsion (AS03) เป็น adjuvant นั้น แม้ว่าสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน RTS,S ได้ดีมากแต่กลับไม่มีผลในการป้องกันโรค ในทางตรงข้ามแอนติเจนชนิดเดียวกันเมื่อใช้ adjuvant ที่มีองค์ประกอบของ monophosphosyl lipid A และ QS21 ใน oil-in-water emulsion สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อมาลาเรียได้²²⁷

สารเสริมฤทธิ์ที่ได้รับการรับรองให้ใช้ในคนในปัจจุบัน มีดังนี้

1. Alum เป็น Aluminum ที่อยู่ในรูปเจลที่ไม่เป็นผลึกเป็น adjuvant ที่ใช้ในวัคซีนหลายชนิดที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น วัคซีนป้องกันโรคคอตีบ ไอกรน และบาดทะยัก รวมทั้งวัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบี เป็นต้น adjuvant ชนิดนี้ยังมีความปลอดภัยสูงสามารถช่วยให้เกิดการกระตุ้นการตอบสนองของแอนติบอดีได้เร็วและมีระดับที่สูง ตลอดจนแอนติบอดีที่สร้างขึ้นอยู่นาน Alum ยังช่วยให้แอนติบอดีในวัคซีนมีความเสถียร อย่างไรก็ตาม Alum ไม่ช่วยให้เกิดการกระตุ้น Th1 cell และ CTL ซึ่งมีความสำคัญต่อภูมิคุ้มกันต่อจุลชีพที่อยู่ในเซลล์ ดังเช่นมาลาเรีย²³⁰

2. MF59 มีองค์ประกอบของ squalene-in-water emulsion โดยมีขนาดละอองฝอยเล็กกว่า 250 นาโนเมตร adjuvant ชนิดนี้ช่วยให้มีการสร้างแอนติบอดีที่ดีกว่า Alum โดยมีการสร้างแอนติบอดี IgG subclass ต่างๆ ได้อย่างสมดุล สามารถกระตุ้น helper T cell ได้ดีมาก แต่ไม่สามารถช่วยให้มีการกระตุ้น Th1 lymphocyte ในปัจจุบัน วัคซีนที่ใช้ adjuvant ชนิดนี้คือ วัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่ บางชนิดที่ผลิตในประเทศสวิสเซอร์แลนด์²³¹

3. MPL เป็น adjuvant ที่สามารถกระตุ้น Th1 cell ที่ได้รับรองให้ใช้ในคนอย่างเป็นทางการ MPL ได้จาก lipopolysaccharide ของ *Salmonella minnesota* ประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophilic polysaccharide และ ส่วนของ hydrophobic lipid core^{232,233} ซึ่งสามารถจับกับตัวรับ TLR4 ได้ adjuvant ชนิดนี้ได้รับการจดสิทธิบัตรเพื่อใช้ในวัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบี และวัคซีนป้องกันเอชพีวี โดยอยู่ในตำหรับ AS04 ซึ่งมีเกลือ aluminum เป็นองค์ประกอบร่วม สำหรับวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่มีการทดลองในภาคสนามนั้นได้มีการใช้ adjuvant ชนิดนี้ในตำหรับต่างๆ โดยรวมกับ adjuvant อื่นๆ เช่น liposome และ saponin เป็นต้น²³⁴⁻²³⁶

สารเสริมฤทธิ์สำหรับวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียมีดังนี้

1. Montanides (ISA51 และ ISA720) เป็น water-in-oil emulsion ประกอบด้วย squalene และ mannide-monoate มีคุณสมบัติทางกายภาพคล้ายกับ incomplete Freund's adjuvant^{237,238} แต่สามารถสลายตัวได้ Montanides ได้ถูกนำมาใช้สำหรับวัคซีนป้องกันมาลาเรียในตำหรับ ISA720 โดยให้ผลการช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีมาก แต่มีข้อเสียคือ มีการตอบสนองเฉพาะที่ในตำแหน่งที่ฉีดวัคซีนอื่นไม่พึงประสงค์ รวมทั้งความเสถียรของวัคซีนยังไม่มากพอ^{239,240}

2. Saponins มีหลายชนิด ได้แก่ Quil-A, immunostimulating complexes (ISCOM), QS-21, AS02 และ AS01 โดย adjuvant กลุ่มนี้ได้จาก triterpene glycosides ที่มาจากเปลือกไม้ชนิดหนึ่ง ซึ่ง saponin ชนิดที่ถูกนำมาทดลองมากที่สุดคือ Quil-A มีองค์ประกอบของ

glycosides หลายชนิดซึ่งมีฤทธิ์ในการเป็น adjuvant และมีส่วนที่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง²⁴¹ สำหรับ ISCOM มีองค์ประกอบของ phospholipids, cholesterol และ Quil-A ส่วนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีโครงสร้างคล้ายกรง (cage-like particle) ขนาด 40 นาโนเมตร สามารถดักจับแอนติเจนไว้ภายใน²⁴² ส่วน QS-21 เป็นส่วนของ Quil-A ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยปราศจากผลข้างเคียงและสามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้มากขึ้นทั้งการสร้างแอนติบอดี Th1 และ CTL ข้อเสียของ adjuvant ชนิดนี้คือความไม่เสถียรทางเคมีและการกระตุ้นเฉพาะที่อันไม่พึงประสงค์ในตำแหน่งที่ฉีดวัคซีน²⁴³

3. MPL ตำหรับต่างๆ และตำหรับผสม เช่น MPL-SE ประกอบด้วย Squalene oil, 3-deacylated monophosphoryl lipid A และสารที่เป็น carrier ผลิตในรูปของ oil-in-water emulsion ซึ่งได้นำมาใช้สำหรับวัคซีนป้องกันโรคไลชมาเนีย (leishmaniasis)²⁴⁴ ส่วน AS02 เป็น oil-in-water emulsion เช่นกัน มีองค์ประกอบของ MPL และ QS-21 ซึ่งสามารถช่วยให้เกิดการกระตุ้นทั้งการสร้างแอนติบอดีและ Th1 lymphocyte ที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับ AS01 คือ MPL และ QS21 ที่อยู่ในรูปของ liposome^{236,245}

4. นิวคลีโอไทด์สายสั้น (oligonucleotides) ที่มีส่วนของ unmethylated CpG ทำหน้าที่โดยผ่าน TLR9 สามารถกระตุ้น dendritic cell และกระตุ้นการหลั่ง pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) และ IL-12 ซึ่ง CpGs นี้มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ Th1 และ CTL ให้มีการตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดีมาก อย่างไรก็ตาม adjuvant ชนิดนี้ให้ผลการตอบสนองที่ต่างกันในสัตว์ต่างชนิดกันแม้จะมีความปลอดภัยสูง^{246,247}

5. Imidazoquinolines เป็นสารสังเคราะห์ที่ช่วยกระตุ้น antigen presenting cells (APCs) ชนิดต่างๆ และการหลั่งของ inflammatory cytokines และ chemokines หลายชนิด โดย adjuvant ชนิด imiquimod ทำหน้าที่เป็นตัวจับกับ TLR7 ส่วน resiquimod เป็นตัวจับ TLR7/8 โดย imiquimod สามารถใช้ทาเฉพาะที่ซึ่งจะมีผลต่อ antigen

presenting cell ที่ผิวหนัง^{235,240}

รูปแบบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย

ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียนั้น ได้มีการใช้นวัตกรรมร่วมสมัยหลายประเภท ซึ่งรูปแบบของวัคซีนที่ต่างกันล้วนมีข้อดี และข้อจำกัดแตกต่างกัน เนื่องจากการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียมีลำดับขั้นตอนตั้งแต่การศึกษาในหลอดทดลอง การทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลองต่างๆ และการทดสอบในอาสาสมัคร ซึ่งมีข้อมูลมากเกินกว่าที่จะรวบรวมได้ครบถ้วน ดังนั้นในที่นี้จึงครอบคลุมเฉพาะวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อ *P.falciparum* ที่ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เป็นที่ต้องการอย่างเร่งด่วนมากกว่าวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียชนิดอื่น เป็นวัคซีนที่อยู่ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพในคนและมีศักยภาพที่ดีในการป้องกันโรค ดังนั้นวัคซีนในกลุ่มของ transmission-blocking vaccines ที่ไม่ให้ผลดีต่อผู้ได้รับวัคซีนโดยตรงจึงยังไม่ได้รับการทดสอบในภาคสนามอย่างชัดเจน ซึ่งประเภทหรือรูปแบบที่เป็นองค์ประกอบหลักของวัคซีนสามารถจำแนกได้ดังนี้

1. วัคซีนที่มีเชื้อมาลาเรียเป็นองค์ประกอบ (whole parasite vaccines)

การพัฒนาวัคซีนในอดีตที่ประสบผลสำเร็จในการป้องกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและไวรัสไม่ได้อาศัยความรู้เกี่ยวกับกลไกการป้องกันโรคโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอย่างครอบคลุมและขั้นตอนการพัฒนาตลอดจนการนำวัคซีนไปทดสอบนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับเงื่อนไขและข้อจำกัดมากเท่าในปัจจุบัน แต่วัคซีนหลายชนิดที่พัฒนาขึ้นจากการใช้เชื้อจุลชีพก่อโรคที่ทำให้ตายแล้ว (whole killed vaccines) เช่น วัคซีนป้องกันโรคไอกรน โรคหัด และอหิวาตกโรค เป็นต้น หรือวัคซีนที่ได้จากเชื้อที่มีชีวิตแต่ถูกทำให้อ่อนกำลังหรือขาดความสามารถในการก่อโรค (live attenuated vaccines) เช่น วัคซีนป้องกันโรคหัด และอหิวาตกโรคที่ถูกพัฒนาต่อมา รวมทั้งวัคซีนป้องกันโรคโปลิโอ โรคหัด และโรคคางทูม เป็นต้น ซึ่งวัคซีนที่ถูกพัฒนาด้วยกระบวนการดังกล่าว ให้ผลการป้องกันโรคที่ดี และมีความคุ้มค่าอย่างมากในเชิงสาธารณสุข

สำหรับการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียโดยอาศัยหลักการใช้เชื้อมาลาเรียระยะที่เจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงที่ตายแล้วเป็นวัคซีนนั้น มีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1941 โดยทำการทดลองในลิง²⁴⁸ นอกจากนี้ยังมีการใช้เชื้อมาลาเรียที่ผ่านการฉายรังสีแล้วเป็นวัคซีนสำหรับทดสอบในลิงและในหนูทดลองอีกหลายครั้งโดยใช้เชื้อมาลาเรียชนิดที่สามารถก่อโรคในสัตว์ที่ใช้ทดสอบ เช่น ในกรณีของลิงวอก (rhesus macaque) มักใช้ *P.knowlesi* หรือในกรณีของ *P.falciparum* มักทำการศึกษาในลิง *Aotus* หรือลิง *Saimiri* ส่วนในกรณีของหนูทดลองสามารถเลือกใช้เชื้อมาลาเรียหลายชนิด เช่น *P.chabaudi*, *P.vinckei*, *P.yoelii* และ *P.berghei* เป็นต้น ซึ่งผลการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนจากการใช้ตัวเชื้อมาลาเรียเป็นวัคซีนนั้นมีความแตกต่างกัน แต่ผลส่วนใหญ่มักให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคจากการติดเชื้อซ้ำในอัตราที่สูง โดยบางครั้งอาจให้ผลการป้องกันโรคได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามการใช้ตัวเชื้อมาลาเรียเป็นวัคซีนโดยตรงร่วมกับ adjuvant นั้น ในอดีตมีข้อจำกัดอย่างมากในการเตรียมเชื้อให้ได้ปริมาณมาก ดังนั้นแนวทางการพัฒนาวัคซีนดังกล่าวจึงไม่ได้มีการดำเนินการต่ออย่างชัดเจน ซึ่งแม้ว่าในปี ค.ศ. 1976 Trager และ Jensen ได้พัฒนาวิธีการเลี้ยงเชื้อ *P.falciparum* ได้อย่างต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นรากฐานในการผลิตเชื้อมาลาเรียดังกล่าวในปริมาณมากๆ ได้²⁴⁹ แต่ในระยะเวลาเดียวกันเทคโนโลยีด้านการผลิตโปรตีนลูกผสม ซึ่งเป็นรากฐานของการพัฒนาวัคซีนที่เลือกใช้เฉพาะแอนติเจนที่สำคัญที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อได้ ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนโดยใช้ตัวเชื้อมาลาเรียเป็นองค์ประกอบของวัคซีนจึงไม่ได้รับการพัฒนาอย่างชัดเจน

การใช้เชื้อมาลาเรียทั้งตัวเป็นองค์ประกอบของวัคซีนนั้นนอกจากจะใช้เชื้อตายหรือเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีแล้วยังมีการใช้เชื้อมาลาเรียที่มีชีวิตเพื่อทำให้เกิดการติดเชื้อในร่างกายของโฮสต์ โดยพบว่าหนูทดลองหรือลิงบางชนิดเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อเพียงเล็กน้อยแล้วให้ยาฆ่าเชื้อมาลาเรียตามมาในภายหลัง (infection-cure model) ซึ่งผลการศึกษาพบว่าวิธีดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้หนูเกิด

ภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์เดียวกันกับที่ใช้เป็นวัคซีน (homologous parasite) ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นสามารถป้องกันการติดเชื้อต่างสายพันธุ์ (heterologous parasite) ได้เพียงบางส่วน ทั้งนี้ภูมิคุ้มกันดังกล่าวจะป้องกันการติดเชื้อต่างสายพันธุ์ได้ดีเพียงใดขึ้นกับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเชื้อที่ใช้เป็นวัคซีนและเชื้อที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันโรคของวัคซีน นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงเวลาที่ยาต้านมาลาเรียภายหลังการติดเชื้อมีความสำคัญอย่างมากต่อภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น รวมทั้งพบว่าปริมาณของเชื้อที่ใช้เพื่อก่อให้เกิดการติดเชื้อซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนติเจนที่โฮสต์จะได้รับเพื่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอย่างเหมาะสม²⁵⁰⁻²⁵² สำหรับการศึกษาในอาสาสมัครซึ่งไม่เคยติดเชื้อมาลาเรียมาก่อน โดยการฉีดเชื้อ *P.falciparum* ระยะที่เจริญในเม็ดเลือดแดงแบบไม่อาศัยเพศประมาณ 30 เซลล์เข้าไปในอาสาสมัครจำนวน 5 ราย หลังจากนั้นจึงให้ยา chloroquine เพื่อฆ่าเชื้อก่อนที่จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากจนสามารถก่อโรคได้ ทำเช่นนี้ซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบโดยฉีดเชื้อระยะและสายพันธุ์เดียวกันเข้าไปในอาสาสมัครพบว่าอาสาสมัครส่วนใหญ่ไม่พบการติดเชื้อเลยแม้จะทำการตรวจสอบโดยวิธี PCR ในขณะที่อาสาสมัคร 1 ราย มีการติดเชื้อเกิดขึ้นแต่ระยะเวลาตรวจพบเชื้อเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ เมื่อทำการวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ที่เกิดภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อพบว่าอาสาสมัครเหล่านี้มีการตอบสนองของ T cell อย่างชัดเจน โดยพบการเพิ่มขึ้นของ CD4+ และ CD8+ T cells รวมทั้งปริมาณ IFN- γ มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมาก ในขณะที่ IL-4 และ IL-10 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ nitric oxide synthase ใน mononuclear cells ที่อยู่ในกระแสเลือดมีค่าสูงมาก ในทางตรงข้ามไม่พบการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียในอาสาสมัครเหล่านี้เลย ผลการทดสอบนี้แสดงว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immune response โดยปราศจากการสร้างแอนติบอดีสามารถทำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียระยะที่เจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพ²⁵³ ในทำนองเดียวกัน

ได้มีการทดสอบโดยใช้ระยะ sporozoite จากยุงเป็นวัคซีนพบว่าอาสาสมัครที่ได้รับเชื้อจากยุงกันปล่องทั้งสิ้น 3 ครั้ง พร้อมกับได้รับประทานยา chloroquine อยู่ตลอดเวลาที่ศึกษา หลังจากนั้นจึงรับประทานยา chloroquine เป็นเวลา 1 เดือน อาสาสมัครเหล่านี้จึงได้รับการทดสอบความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย โดยให้ยุงที่มีเชื้อสายพันธุ์เดิมกัด พบว่าอาสาสมัครทุกรายที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีดังกล่าวไม่เกิดการติดเชื้อมาลาเรียในภายหลังการทดสอบเลย จากการศึกษาการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในอาสาสมัครกลุ่มนี้พบว่ามีเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่สร้าง cytokine ชนิดต่างๆ อย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการเพิ่มขึ้นของ CD3+ CD45R0+ memory T cells พร้อมกับการตอบสนองของ CD4+ และ CD8+ T lymphocytes อย่างชัดเจน ในทางตรงข้ามการตอบสนองของแอนติบอดีนั้นเกิดขึ้นมีเพียงเล็กน้อย²⁵⁴

เนื่องจากข้อมูลการใช้ sporozoite ที่ผ่านการฉายรังสีเป็นวัคซีนในอาสาสมัครได้มีการตรวจสอบหลายครั้งโดยพบว่าวัคซีนในรูปแบบนี้สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์ในอาสาสมัครมากถึงร้อยละ 94 ทั้งนี้ sporozoite ที่ผ่านการฉายรังสีจะยังคงมีชีวิตและสามารถลุกลามเข้าไปเจริญในเซลล์ตับได้หลายสัปดาห์หรือหลายเดือน แต่ไม่สามารถแบ่งเซลล์ต่อไปได้ ภาวะดังกล่าวทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อระยะ sporozoite ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยอาศัย cytotoxic CD8+ T cell และแอนติบอดี แต่โดยทั่วไปประสิทธิภาพของวัคซีนนี้มีระยะเวลาเพียงประมาณ 1 ปี ดังนั้นแม้ว่าผู้ที่ได้รับวัคซีนที่อาศัยในเขตปรากฏโรคมาลาเรียแม้จะได้รับการกระตุ้นจากการได้รับ sporozoite จากยุงในธรรมชาติ แต่การกระตุ้นด้วยวัคซีนดังกล่าวยังคงมีความจำเป็นจึงนับเป็นข้อจำกัดประการหนึ่งของวัคซีนชนิดนี้อันเนื่องมาจากกระบวนการผลิตวัคซีนที่ไม่สามารถผลิต sporozoite ได้มากพอสำหรับประชากรจำนวนมาก อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนาวัคซีนโดยใช้ sporozoite ที่ผ่านขั้นตอนการปรับเปลี่ยนทางพันธุกรรมโดยการกำจัดยีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการแบ่งตัวของเชื้อมาลาเรีย เช่น ยีน UIS3, UISE4 และ P3bp เป็นต้น ซึ่ง sporozoite เหล่านี้ยังคงมี เมตาโบลิซึมของ

เซลล์คงเดิมแต่ไม่สามารถเจริญและแบ่งตัวในเซลล์ตัวต่อไปซึ่งในปัจจุบันได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนรูปแบบนี้ภายใต้ชื่อ Sanaria™ PfSPZ vaccine²⁵⁵

2. วัคซีนที่ใช้โปรตีนลูกผสมเป็นองค์ประกอบ (recombinant protein vaccines)

หลักการพัฒนาวัคซีนโดยใช้โปรตีนลูกผสมเป็นองค์ประกอบของวัคซีนต้องอาศัยองค์ความรู้ทางด้านพยาธิกำเนิดระดับโมเลกุลของการติดเชื้อ เพื่อการยับยั้งขั้นตอนต่างๆ ที่จุลชีพก่อพยาธิสภาพในโฮสต์ เช่น การยับยั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวรับ และตัวจับขณะที่จุลชีพจะเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ หรือยับยั้งเมตาโบลิซึมของจุลชีพ เป็นต้น การคัดเลือกเป้าหมายที่จะทำการยับยั้ง การคัดเลือกเป้าหมายในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีผลในการยับยั้งกระบวนการก่อโรคหรือการทำลายจุลชีพ และการพัฒนาระบบนำส่งแอนติเจนในวัคซีน รวมทั้งรูปแบบของแอนติเจนเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีน ซึ่งล้วนมีความสำคัญและส่งผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีน

เนื่องจาก genome ของเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P.falciparum* มีองค์ประกอบของเบส adenine และ thymine สูงถึงร้อยละ 80 ทำให้การใช้ codon เพื่อสร้างกรดอะมิโนมีความแตกต่างอย่างมากกับ expression vector ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสม การปรับเปลี่ยน codon โดยการสังเคราะห์ยีนใหม่เพื่อให้เหมาะสมกับการผลิตโปรตีนดังกล่าวจึงอาจมีความจำเป็น นอกจากนี้การมี glycosylation sites ในโปรตีนลูกผสมยังมีผลต่อประสิทธิภาพในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันภายหลังได้รับวัคซีน เช่น โปรตีนลูกผสม MSP1 ในส่วน C-terminus ขนาด 42 กิโลดาลตัน (PfMSP142), PfAMA-1 และ PfEBA175 ที่มี glycosylation sites สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ดีมาก และแอนติบอดีดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองได้ ในขณะที่การปรับเปลี่ยน glycosylation sites ในโปรตีนเหล่านี้ อาจส่งผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เช่น อาจทำให้การตอบสนองของแอนติบอดีลดลง เป็นต้น²⁵⁶

การปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนลูกผสม อาจส่งผลกระทบต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น อาจทำให้การจับกันระหว่างแอนติเจนและ HLA class I และ class II เปลี่ยนแปลงไป หรืออาจทำให้เกิดการกระตุ้น regulatory T cell จนเกิดการยับยั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ นอกจากนี้ epitope ในแอนติเจนอาจอยู่ในตำแหน่งซ่อนเร้นหรือ cryptic epitope เช่น ถูกบดบังด้วยโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน จึงไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งเมื่อทำให้โครงสร้างของโปรตีนที่บดบัง epitope เปลี่ยนสภาพไป อาจทำให้ cryptic epitope สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงในลำดับกรดอะมิโนบางตำแหน่งยังอาจมีผลต่อการเกิด altered peptide ligand antagonism หรือ T cell mimotope ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหรือการกระตุ้นเกิดขึ้นในทิศทางที่ไม่ทำให้เกิดภูมิคุ้มกันที่ป้องกันการติดเชื้อ เช่น เปลี่ยนการกระตุ้น CD4+ T cell ในทิศทาง pro-inflammatory (Th1) เป็น anti-inflammatory (Th2) เป็นต้น ซึ่งได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น²⁵⁶

นับตั้งแต่มีการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย โดยอาศัยการผลิตโปรตีนลูกผสมซึ่งมีหลายชนิดนั้น มีเพียงบางชนิดที่ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องถึงปัจจุบัน ดังนี้

2.1 วัคซีน RTS,S

วัคซีนชนิดนี้เริ่มต้นจากความร่วมมือระหว่าง Water Reed Army Institute of Research (WRAIR) กับ GlaxoSmithKline (GSK) ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย โดยเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1984 โปรตีนที่เลือกเป็นองค์ประกอบหลักของวัคซีนคือ circumsporozoite protein หรือโปรตีน CS เนื่องจากมีองค์ความรู้เกี่ยวกับโปรตีนชนิดนี้อย่างมากทั้งในด้านโครงสร้าง บทบาทหน้าที่ และการสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อโปรตีนดังกล่าว สำหรับรูปแบบของโปรตีนที่ผลิตอาศัยการสร้างโปรตีนลูกผสมใน *Escherichia coli* ทั้งนี้โปรตีนที่ผลิตขึ้นนั้นครอบคลุมโปรตีน CS หลายส่วนและมีการผลิตให้มีโครงสร้างที่หลากหลาย²⁵⁷ แต่จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการในระยะแรก พบว่ามีโปรตีนลูกผสมเพียงไม่กี่ชนิด

ที่มีศักยภาพในการเป็นวัคซีนและมีการประเมินผลของวัคซีนจนถึง Phase IIb ในอาสาสมัครชาวไทยและเคนยา ผลการศึกษาดังกล่าวรายงานไว้ในปี ค.ศ. 1994 และ 1996 ตามลำดับ^{258,259} ซึ่งผลที่ได้กลับพบว่าวัคซีนจากโปรตีน CS ไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคมาลาเรียอย่างชัดเจน ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนดังกล่าวจึงยุติลง จนกระทั่ง GSK ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบี โดยใช้ HBsAg (S antigen) โปรตีนลูกผสมที่ผลิตในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นองค์ประกอบของวัคซีน ซึ่งเมื่อ HBsAg หรือ S protein ที่ถูกสร้างขึ้นจะรวมตัวกันเองเป็น virus-like particle ภายในยีสต์²⁶⁰ จากประสบการณ์ดังกล่าว GSK จึงกลับมาผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย โดยผลิตโปรตีนลูกผสมที่มีองค์ประกอบของ tetrapeptide repeats (NANP) ของโปรตีน CS ซ้ำกัน 16 ชุด และโปรตีน HBsAg เรียกว่าวัคซีน R16-HBsAg แต่จากการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในอาสาสมัครกลับพบว่าวัคซีนดังกล่าวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้น้อยมาก²⁶¹ ในขณะที่เดียวกันวัคซีนชนิดใหม่ที่มีองค์ประกอบครอบคลุมบริเวณ tetrapeptide repeats ซึ่งมี B cell epitopes จนถึงส่วน C-terminus ของโปรตีน CS ซึ่งประกอบด้วย T cell epitopes อย่างน้อย 3 epitopes ได้ถูกพัฒนาขึ้นภายใต้ชื่อวัคซีน RTS,S โดย R หมายถึง NANP repeats ส่วน T บ่งบอกว่ามี T cell epitopes ของโปรตีน CS เป็นองค์ประกอบที่เชื่อมกับ HBsAg หรือ S protein สำหรับ S ตัวสุดท้ายแสดงว่ามี S protein ที่ไม่ได้เชื่อมกับโปรตีน CS ดังกล่าวเป็นองค์ประกอบรวมในวัคซีน

ในการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน RTS,S ในอาสาสมัคร Phase I/IIa เพื่อศึกษาความปลอดภัย ความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและประสิทธิภาพของวัคซีนได้ดำเนินการในปี ค.ศ. 1995 พบว่าอาสาสมัคร 2 รายใน 8 รายที่ได้รับวัคซีน RTS,S ร่วมกับ Alum และ MPL สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้เป็นผลสำเร็จ ในขณะที่อาสาสมัคร 6 ราย ที่ได้รับวัคซีน RTS,S ร่วมกับ Alum ไม่เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อเลย²⁶² ในระยะต่อมาได้มีการพัฒนา adjuvant ใหม่อีกหลายขนาน จึงมีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน

จากการเปลี่ยน adjuvant ชนิดต่างๆ พบว่าอาสาสมัครที่ได้รับวัคซีน RTS,S/AS04 จำนวน 1 รายใน 8 ราย เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย ส่วนกลุ่มที่ได้รับวัคซีน RTS,S/AS03 จำนวน 2 รายใน 7 รายที่มีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้น ซึ่งดีกว่าประสิทธิภาพของวัคซีน RTS,S/AS02A (ตารางที่ 1) ที่ให้ผลในการป้องกันโรคในอาสาสมัครมากถึง 6 ใน 7 ราย ต่อมาในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน RTS,S/AS02A phase I/IIa หลายครั้งพบว่าผู้ได้รับวัคซีนร้อยละ 40 เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย²⁶³⁻²⁶⁵ ต่อมาได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนดังกล่าวใน phase IIb ในกลุ่มผู้ใหญ่ในประเทศแกมเบีย โดยให้วัคซีน 3 ครั้ง คือ เดือนที่ 0, 1 และ 5 ซึ่งจากการเฝ้าติดตามประสิทธิภาพของวัคซีนต่อเนื่องหลังจากนั้น 15 สัปดาห์ พบว่าร้อยละ 34 ของผู้ที่ได้รับวัคซีนมีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย และหลังจากนั้นประสิทธิภาพของวัคซีนจะลดลง แต่เมื่อทำการกระตุ้นด้วยการฉีดวัคซีนอีกครั้งในเดือนที่ 19 พบว่าร้อยละ 47 ของผู้ที่ได้รับวัคซีนเกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย จากการติดตามเป็นเวลา 9 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นไม่ได้จำเพาะต่อสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของ *P.falciparum* และยังสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีน CS และ HBsAg เป็นเวลานานถึง 5 ปี^{266,267}

จากการพบว่าประสิทธิภาพของวัคซีน RTS,S/AS02A ได้ผลดีในผู้ใหญ่จึงได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในเด็กโดยใช้ขนาดของวัคซีนลดลงครึ่งหนึ่ง เรียกว่า RTS,S/AS0D ในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในเด็กอายุ 1 ถึง 4 ปี ในประเทศโมแซมบิกจำนวน 2,022 ราย โดยให้วัคซีนในเดือนที่ 0, 1 และ 2 ซึ่งจากการติดตามเป็นเวลา 6 เดือน ภายหลังจากวัคซีนครั้งสุดท้าย พบว่าเด็กที่ได้รับวัคซีนมีจำนวนครั้งของอาการของโรคมาลาเรียลดลงร้อยละ 29 และอุบัติการณ์ของภาวะมาลาเรียที่รุนแรงลดลงร้อยละ 58 และเมื่อติดตามต่อไปเป็นเวลา 18 เดือนพบว่าอุบัติการณ์ดังกล่าวลดลงเหลือร้อยละ 35 และ 49 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อติดตามต่อไปเป็นเวลา 45 เดือน พบว่าอุบัติการณ์เหล่านี้ยังคงลดลงเหลือร้อยละ 26 และ 38 ตามลำดับ รวมทั้งพบว่าอุบัติการณ์

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของวัคซีน RTS,S รูปแบบต่างๆ ที่ใช้ในภาคสนาม

Formulation	RTS,S	MPL (µg)	QS21 (µg)	Final volume (µg)	Adjuvant system (ml)
RTS,S/AS02A	50	50	50	0.5	oil-in-water emulsion
RTS,S/AS02D	25	25	25	0.5	oil-in-water emulsion
RTS,S/AS01B	50	50	50	0.5	liposome-based
RTS,S/AS01E	25	25	25	0.5	liposome-based

(จากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 257)

การพบเชื้อในกระแสเลือดของผู้ที่ได้รับวัคซีนมีค่าต่ำกว่าผู้ที่ไม่ได้รับวัคซีนร้อยละ 34^{268,269} ในการผนวกวัคซีน RTS,S/AS0D กับโปรแกรมการฉีดวัคซีนป้องกันโรคสำหรับเด็ก โดยฉีดร่วมกับวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ ไอกรน บาดทะยัก และ *Haemophilus influenzae* type b (Hib) ในเด็กโมแซมบิก เมื่อมีอายุ 8, 12 และ 16 สัปดาห์ พบว่าวัคซีนดังกล่าวมีความปลอดภัย ไม่มีผลกระทบต่อการตอบสนองของวัคซีนใน expanded program on immunization (EPI) เมื่อให้ร่วมกันและยังคงประสิทธิภาพในการป้องกันโรคมาลาเรียได้ถึงร้อยละ 66 เมื่อติดตามเป็นเวลา 3 เดือน หลังได้รับวัคซีนเข็มสุดท้าย ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในลักษณะเดียวกันในเด็กประเทศแทนซาเนีย²⁷⁰

ในระหว่างการทดสอบวัคซีน RTS,S/AS02 ซึ่ง adjuvant อยู่ในรูปของ oil-in-water emulsion นั้นได้รับการประเมินวัคซีน RTS,S/AS01 ควบคู่ไปด้วยโดย adjuvant อยู่ในรูปของ liposome ซึ่ง adjuvant ทั้ง 2 มีองค์ประกอบของ MPL และ QS21 ในปริมาณเท่ากัน พบว่าวัคซีน RTS,S/AS01B สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ T cell อย่างจำเพาะต่อโปรตีน CS ในทิศทางของ Th1 ได้มากกว่าวัคซีน RTS,S/AS02A อย่างมีนัยสำคัญในลิงทดลอง²⁷¹ ซึ่งผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการทดสอบในอาสาสมัคร phase IIa และพบว่าวัคซีน RTS,S/AS01B สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีรวมทั้งการตอบสนองของ CD4+ T cell ที่จำเพาะต่อโปรตีน CS ในระดับที่มากกว่าการใช้วัคซีน RTS,S/AS02A นอกจากนี้ยังพบว่าวัคซีน RTS,S/AS01B ให้ผลการป้องกัน

โรคได้สูงถึงร้อยละ 50 ในขณะที่วัคซีน RTS,S/AS02A ให้ผลเพียงร้อยละ 32²⁷² ผลเปรียบเทียบกับกล่าวยังมีความสอดคล้องกับการศึกษาในภาคสนามในผู้ใหญ่ในประเทศเคนยา และผลของวัคซีนในเด็กอายุ 18 เดือนถึง 4 ปี ในประเทศกาบอง ซึ่งวัคซีนในเด็กที่ใช้คือ RTS,S/AS01E ที่มีขนาดลดลงครึ่งหนึ่งจากวัคซีนที่ใช้ในผู้ใหญ่ ข้อมูลเหล่านี้ล้วนให้ผลสนับสนุนถึงประสิทธิภาพที่ดีกว่าของ RTS,S/AS01 สำหรับการศึกษาวัดกัน RTS,S/AS01E ในเด็กเล็กอายุ 5 ถึง 17 เดือนในประเทศเคนยาและแทนซาเนีย พบว่าจากการติดตามเป็นเวลา 8 เดือน หลังได้รับวัคซีนเข็มสุดท้ายพบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ร้อยละ 53 ซึ่งความสำเร็จเหล่านี้ได้มีการประเมินผลทดสอบโดยให้ร่วมกับวัคซีนอื่นๆ ใน EPI พร้อมกับการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนใน phase III ซึ่งได้เริ่มในปี ค.ศ. 2009 โดยจะเป็นการประเมินในลักษณะ double-blind ซึ่งคาดว่าจะเป็นการศึกษาในจำนวนประชากรขนาดใหญ่คือในเด็กอายุน้อยกว่า 2 ขวบ จำนวน 16,000 ราย ใน 7 ประเทศที่อยู่ในแอฟริกา ซึ่งผลประเมินจะได้รับข้อสรุปในปี ค.ศ. 2011 นี้²⁵⁷ ถ้าประสิทธิภาพของวัคซีน RTS,S/AS01E ให้ผลในการลดจำนวนผู้ที่มีอาการของโรคมาลาเรียได้ถึงร้อยละ 50 ภายใน 1 ปี หลังได้รับวัคซีนย่อมให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ทัดเทียมกับการควบคุมโรคมาลาเรียด้วยวิธีอื่น เช่น การใช้มุ้งชุบยาฆ่าแมลง (insecticide treated bed nets) หรือการให้ยารักษาโรคมาลาเรียเป็นระยะในทารก (intermittent preventive treatment) ทำให้

องค์รวมของการควบคุมโรคมาลาเรียประสบผลสัมฤทธิ์มากขึ้น

2.2 วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียระยะเจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงจากโปรตีนลูกผสม

องค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ผู้ที่ได้รับเชื้อมาลาเรียเกิดภูมิคุ้มกันในรูปของ clinical immunity นั้นเนื่องมาจากบทบาทของแอนติบอดีต่อระยะต่าง ๆ ที่เจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบว่าโปรตีนใดของเชื้อมาลาเรียเหล่านี้ที่มีผลให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียหรือผู้ติดเชื่อต้องมี HLA แบบใดจึงจะเกิดการสร้างภูมิคุ้มกันดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามนับตั้งแต่มีการพัฒนาการเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P.falciparum* ได้อย่างต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการ ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางอนุชีววิทยาและการผลิตโปรตีนลูกผสม ทำให้มีการค้นพบโปรตีนหลายชนิดที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนที่สำคัญดังนี้

2.2.1 วัคซีนโปรตีนลูกผสมจาก merozoite surface protein 1 ส่วนของ MSP1 ที่ได้รับความสนใจในการพัฒนาวัคซีน คือ บริเวณ C-terminus ของโปรตีนซึ่งมี epidermal growth factor-like domain ที่สร้างพันธะ disulfide เป็น 2 loops เรียกว่า MSP1₁₉ ซึ่งมีขนาด 19 กิโลดาลตัน ได้มีการผลิตโปรตีนลูกผสมจากโปรตีนส่วนนี้ของเชื้อ *P.falciparum* สายพันธุ์ 3D7 และ FVO เชื่อมกับ T cell epitopes ของ tetanus toxoid ในรูปของ Alhydrogel แต่จากการทดสอบในอาสาสมัคร phase I พบว่าวัคซีนนี้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้้น้อยมาก ดังนั้นในภายหลังจึงมีการพัฒนาวัคซีนโดยนำส่วน C-terminus ที่ครอบคลุมบริเวณ MSP1₄₂ ซึ่งมี MSP1₁₉ และ MSP1₃₃ ที่มี 2 รูปแบบเข้ามาเป็นองค์ประกอบของวัคซีน โดยใช้ AS02 เป็น adjuvant เมื่อทำการทดสอบในอาสาสมัคร phase I พบว่าวัคซีนดังกล่าวมีความปลอดภัยและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี และเมื่อทดสอบในเด็กชายอายุตั้งแต่ 1 ถึง 3 ปี พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบวัคซีนดังกล่าวใน phase IIb ในเด็กชายเคนยาเช่นกัน พบว่าแม้ผู้ได้รับวัคซีนจะมีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน MSP1 แต่กลับไม่พบว่ามีประสิทธิภาพในการ

ป้องกันโรคเลย ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่าแอนติบอดีที่เกิดขึ้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงเลย ดังนั้นวัคซีนดังกล่าวจึงยังไม่ได้รับการพัฒนาต่อไปอย่างชัดเจน จนกว่าการแก้ปัญหาเหล่านี้จะลุล่วงไปได้²⁷³⁻²⁷⁵

2.2.2 วัคซีนโปรตีนลูกผสมจาก apical membrane antigen1 วัคซีนนี้ใช้ *E.coli* และ *Pichia pastoris* เพื่อผลิต AMA1 จาก *P.falciparum* สายพันธุ์ 3D7 ในส่วน ectodomain ทางด้าน N-terminus ซึ่งครอบคลุมประมาณ 2 ใน 3 ของโปรตีนทั้งหมด โดยใช้ AS02A และ AS01 เป็น adjuvant จากการศึกษาในอาสาสมัคร phase I/IIa พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัย สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อในห้องปฏิบัติการ แต่ไม่เกิดการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย ต่อมาในการศึกษา phase II ในเด็กอายุ 1 ถึง 6 ปี ในประเทศมาลีพบว่าเด็กที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์เดียวกับวัคซีน มีอุบัติการณ์ของอาการของโรคมาลาเรียลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นต่อมาก็จะมีการพัฒนาวัคซีนที่มีส่วนประกอบของโปรตีนจากทั้งสายพันธุ์ 3D7 และ FVO ซึ่งจากการศึกษาในเด็กอายุ 2 ถึง 3 ปี ในประเทศมาลียังให้ผลการป้องกันโรคไม่ดี แต่จากการศึกษาในอาสาสมัครโดยใช้วัคซีน AMA1 ร่วมกับ adjuvant ต่างๆ พบว่า AS02A สามารถกระตุ้นอาสาสมัครให้มีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AMA1 ในระดับที่สูงเทียบเท่าที่พบในผู้ที่มี clinical immunity ที่อาศัยในเขตแพร่ระบาดของมาลาเรีย และพบว่าแอนติบอดีดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงได้ดี ซึ่งวัคซีนนี้อยู่ระหว่างการศึกษาในประเทศมาลี²⁷⁶⁻²⁷⁹

2.2.3 วัคซีนโปรตีนลูกผสมจาก merozoite surface protein 2 โปรตีนลูกผสม MSP2 สามารถผลิตได้ครอบคลุมครบทุกส่วนของโปรตีนโดยใช้ *E.coli* วัคซีนที่มีองค์ประกอบดังกล่าวได้จาก *P.falciparum* สายพันธุ์ 3D7 แม้ว่าจากการศึกษาในอาสาสมัครโดยใช้โปรตีนชนิดนี้ร่วมกับโปรตีน CS หรือร่วมกับส่วน N-terminus ของโปรตีน MSP1 และ RESA ในอาสาสมัคร โดยใช้ Montanide ISA720 เป็น adjuvant ไม่พบว่าแอนติบอดีนี้จะมีผลต่อ

การป้องกันโรคและไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเม็ดเลือดแดงในห้องปฏิบัติการ^{280,281} แต่จากการทดสอบวัคซีนดังกล่าวในเด็กที่อาศัยในป่าบิวินิกินีอายุ 6 ถึง 9 ปี ใน phase I/IIb ที่ไม่ได้รับยาต้านมาลาเรีย ในระหว่างการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน พบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า *P.falciparum* ที่มียีน MSP2 ในรูปแบบของ 3D7 ซึ่งเป็นแบบเดียวกับที่ใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีน มีอุบัติการณ์ต่ำลงอย่างมาก²⁸³ แสดงว่าวัคซีนดังกล่าวมีผลจำเพาะต่อรูปแบบของโปรตีน MSP2 ในปัจจุบันจึงได้มีการผนวกโปรตีน MSP2 อีกรูปแบบหนึ่งคือ FC27 เป็นองค์ประกอบของวัคซีนเพื่อให้ครอบคลุม MSP2 ทั้ง 2 รูปแบบ

2.2.4 วัคซีนโปรตีนลูกผสมจากโปรตีนหลายชนิด ปัจจุบันวัคซีนที่มีองค์ประกอบของโปรตีนต่างชนิดกันของ *P.falciparum* ระยะที่เจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงและอยู่ในระหว่างการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนในอาสาสมัครที่สำคัญได้แก่ 1) วัคซีน PfCP2.9 มีองค์ประกอบของโปรตีน AMA-1 ในส่วนของ domain 3 และโปรตีน MSP1 ในส่วน C-terminus 19 กิโลดาลตัน หรือ MSP1₁₉ ผลิตขึ้นในยีสต์ *P.pastoris* โดยใช้ Montanide ISA720 เป็น adjuvant และ 2) วัคซีน GMZ2 ประกอบด้วยโปรตีน GLURP บริเวณซึ่งไม่มี repeats และไม่มีผลหลากหลายในลำดับกรดอะมิโนระหว่างสายพันธุ์ เชื่อมกับส่วน C-terminus ของโปรตีน MSP3 โปรตีนลูกผสมดังกล่าวผลิตใน *Lactococcus lactis* โดยใช้ Alum เป็น adjuvant จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าวัคซีน CP2.9 สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AMA1 และ MSP1₁₉ และมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดง แต่จากการศึกษาในอาสาสมัครใน phase I อีก 2 ครั้ง กลับไม่พบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียดังกล่าวชัดเจน แม้ว่าผู้ได้รับวัคซีนจะมีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนทั้ง 2 ชนิดในระดับที่สูง ดังนั้นวัคซีนชนิดนี้จึงไม่ได้รับการทดสอบต่อไป^{284,285} สำหรับวัคซีน GMZ2 ซึ่งผลการทำลายเชื้อมาลาเรียอาศัย ADCI จากการศึกษาในอาสาสมัคร phase I พบว่าวัคซีนนี้

สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน GLURP และ MSP3 ในระดับที่สูงและทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนผิวของ merozoite แต่การศึกษาดังกล่าวไม่ได้ประเมินว่าแอนติบอดีที่เกิดขึ้นมีบทบาทในกลไก ADCI หรือไม่²⁸⁶

จากการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนจากโปรตีนลูกผสมเหล่านี้ทำให้เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับแนวทางการพัฒนาวัคซีน ที่ต้องคำนึงถึงปัจจัยหลัก 3 ประการ ได้แก่ 1) รูปแบบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งสามารถประเมินได้จากการทดสอบแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการ เช่น การยับยั้งการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงโดยแอนติบอดีต่อ MSP1 และ AMA1 หรือแอนติบอดีที่เกิดขึ้นไปกระตุ้น monocyte ให้หลั่ง cytokines ที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อมาลาเรียด้วยกลไก ADCI เป็นต้น 2) ปริมาณหรือระดับของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามการที่วัคซีนกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในระดับต่ำอาจทำให้ไม่พบผลของวัคซีนในการป้องกันโรคทั้งที่แอนติบอดีที่เกิดขึ้นอาจมีบทบาทในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อมาลาเรีย แต่ด้วยปริมาณที่น้อยจึงไม่เห็นผลชัดเจน ดังนั้นการกระตุ้นให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันดังกล่าว ด้วยการใช้อาเจนนที่เหมาะสมรวมทั้งต้องคำนึงถึงโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีที่มีคุณภาพในการป้องกันโรคจึงมีความสำคัญ 3) ความจำเพาะของการตอบสนอง ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้าง 3 มิติดังกล่าวข้างต้น ซึ่งในโปรตีนที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน เช่น โปรตีน MSP1 และ AMA1 นั้นต้องอาศัยการสร้างพันธะ disulfide เพื่อให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติ ดังนั้นการเกิดพันธะ disulfide ในรูปแบบที่ไม่เหมาะสมอาจกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีที่ไม่มีคุณภาพ นอกจากนี้ epitope อาจมีองค์ประกอบมาจากส่วนของโปรตีนที่ไม่ต่อเนื่องกัน (discontinuous epitope) ทำให้แอนติบอดีต่อการติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์หนึ่งอาจไม่ตอบสนองต่อ epitope จากสายพันธุ์ที่ต่างไป ในกรณีของแอนติบอดีต่อ PfMSP1₁₉ พบว่ามีผลยับยั้ง merozoite ไม่ให้ลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (inhibiting antibodies) หรืออาจให้ผลตรงข้ามคือไปยับยั้งการทำงานของแอนติบอดี

ที่สามารถยับยั้ง merozoite ทำให้แอนติบอดีดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ต่อไป (blocking antibodies) แอนติบอดีเหล่านี้อาจเกิดขึ้นจากการตอบสนองต่อ conformation-dependent B cell epitopes โดยบาง epitopes อาจเกิดจากการหมุนตัวเข้าใกล้ชิดกันระหว่าง domain ที่อยู่ห่างออกไป ดังนั้นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ allotype เหล่านี้อาจแย่งจับกับเป้าหมาย โดยผลจาก steric hindrance ทำให้ inhibiting antibodies ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ หรือการแทนที่ของกรดอะมิโนในบางตำแหน่ง อาจส่งผลต่อแอนติบอดีในการทำหน้าที่ป้องกัน (inhibitory) ยับยั้ง (blocking) หรือไม่มีผลใดๆ เลย (neutral) อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์ความหลากหลายของ PfMSP₁₉ ในตัวอย่าง *P. falciparum* จากหลายภูมิภาค พบความคงที่ของลำดับกรดอะมิโนใน EGF-like domain ค่อนข้างสูงโดยพบการแทนที่เพียงบางตำแหน่งเท่านั้น²⁵⁷

3. วัคซีนจากเปปไทด์สังเคราะห์ (synthetic peptide vaccines)

ข้อดีของเปปไทด์สังเคราะห์ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน คือ สามารถกำหนดองค์ประกอบและลำดับกรดอะมิโนได้อย่างอิสระและชัดเจนโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือฐานข้อมูลโปรตีน นอกจากนี้เปปไทด์สังเคราะห์ยังมีความเสถียรในอุณหภูมิห้อง สามารถผลิตให้มีความบริสุทธิ์สูงโดยปราศจากสิ่งเจือปน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลชีพก่อโรคต่างๆ ไม่จำเป็นต้องอาศัยฐานการผลิตขนาดใหญ่ สามารถออกแบบให้มี epitopes ต่างๆ ที่ต้องการได้ เพื่อให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในทิศทางที่กำหนด และยังคงมีความเหมาะสมในการปรับแต่งโครงสร้างตามต้องการ อย่างไรก็ตามขั้นตอนสำคัญคือการทราบว่า epitope ไตสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ หลังจากนั้นจึงนำเปปไทด์ที่ได้ไปเชื่อมกับโปรตีนตัวนำ (protein carrier) สำหรับวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียจากการติดเชื้อ *P. falciparum* ที่ได้รับการพัฒนาในรูปของเปปไทด์สังเคราะห์มีดังนี้

3.1 circumsporozoite peptide vaccines วัคซีน

ชนิดนี้อาศัยบริเวณ tetrapeptide repeats ของโปรตีน CS เป็นองค์ประกอบหลัก เนื่องจากแอนติบอดีต่อ epitopes เหล่านี้สามารถจับกับผิวของ sporozoite ทำให้ขัดขวางการเคลื่อนที่ของระยะดังกล่าว รวมทั้งการยับยั้งไม่ให้ sporozoite ลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ นอกจากนี้แอนติบอดีต่อ repeats ยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ sporozoite ที่ผิวหนังในตำแหน่งที่ยูกัด และขัดขวางการลุกลามของ sporozoite เข้าสู่กระแสเลือด ดังนั้นการทราบว่าจะใช้เวลาอยู่บริเวณผิวหนังเป็นเวลานานหลายชั่วโมงก่อนการแพร่กระจายไปยังระบบไหลเวียนภายหลังการกัดของยุงที่มีเชื้อนั้น จึงเป็นไปได้ที่แอนติบอดีต่อโปรตีน CS จะทำหน้าที่กำจัดหรือลดปริมาณ sporozoite ลงได้ตั้งแต่ระยะแรกที่เชื้อเข้าสู่ร่างกาย การกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีที่มีฤทธิ์ยับยั้ง sporozoite ในปริมาณมากนั้นต้องอาศัยการกระตุ้น CD4+ T cells ให้หลั่ง cytokines เพื่อช่วยให้เกิด B cell differentiation และพัฒนาการของ CD8+ memory T cells นอกจากนี้ cytokines เหล่านี้ เช่น IFN- γ ยังมีฤทธิ์ยับยั้งพัฒนาการของ exo-erythrocytic stage ซึ่งพบได้ในเซลล์ตับ รวมทั้งเซลล์บริเวณผิวหนัง และเซลล์ในต่อมน้ำเหลืองในระยะแรกของการติดเชื้อ โดยกระตุ้นการสร้าง inducible nitric oxide synthase (iNOS) และกระตุ้นการสร้าง nitric oxide ในเซลล์ที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ภายใน^{287,288} ทั้งนี้ในวัคซีนมีการนำ T cell epitopes และ B cell epitopes ที่จำเป็นในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวเป็นองค์ประกอบ โดยอาศัยองค์ความรู้พื้นฐานจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ที่ได้รับวัคซีนที่ใช้ sporozoite ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ และสามารถป้องกันการติดเชื้อในภายหลังได้เป็นหลัก สำหรับรูปแบบของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนในกลุ่มนี้ที่ได้รับการพัฒนาและให้ผลการศึกษาที่ดีมีดังนี้

3.1.1 วัคซีนที่มีองค์ประกอบของเปปไทด์เป็นแขนง (branched peptide vaccines) ในอดีตมีการใช้วัคซีนเปปไทด์สังเคราะห์ทดลองในอาสาสมัครซึ่งประกอบด้วย repeats ในโปรตีน CS ของ *P. falciparum* เรียงกัน 3 ชุด ร่วมกับการใช้ tetanus toxoid เป็น adjuvant เรียกว่า (NANP)₃-TT conjugate vaccine นั้น

แม้ว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของแอนติบอดีได้ในครั้งแรกที่ได้รับวัคซีน แต่เมื่อใช้วัคซีนดังกล่าวเพื่อกระตุ้นซ้ำกลับไม่พบการสร้างแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นจากเดิมอย่างชัดเจน (ไม่เกิด anamnestic response) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวัคซีนจากเปปไทด์สังเคราะห์ในลักษณะของ multiple antigen peptide (MAP) โดยมีแกนกลางประกอบด้วย non-cationic polylysine core matrix ซึ่งสามารถเชื่อมกับเปปไทด์หลายสาย ในลักษณะการแตกแขนง (branched peptide)²⁸⁹ องค์ประกอบของเปปไทด์ที่ใช้เป็นวัคซีนที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อไปมีดังนี้

3.1.1.1 วัคซีน (T1B)₄ MAP ประกอบด้วย NANP เรียงซ้ำกัน 3 ชุด เป็นส่วนของ B cell epitope สำหรับ T cell epitope ประกอบด้วย NANPNVDP 2 ชุด คั่นระหว่าง B cell epitopes ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ tetrapeptide repeats ในโปรตีน CS เช่นกัน ทำหน้าที่กระตุ้น T helper epitope เพื่อให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันผ่าน Th1 จากการทดลองในลิงและหนูทดลอง พบว่าวัคซีนในรูปแบบนี้สามารถกระตุ้นให้เกิด anamnestic response ได้ดี²⁹⁰ สำหรับการทดสอบ phase I ในคนโดยใช้วัคซีน (T1B)₄ MAP และใช้ Alum ร่วมกับ QS21 พบว่าการตอบสนองของแอนติบอดีในระดับที่สูงทัดเทียมกับที่ใช้ sporozoite ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ เป็นวัคซีนเกิดขึ้นในอาสาสมัครที่มี HLA ที่จำเพาะ คือ DQB1*0603, DRB1*0401 และ DRB1*1101 ซึ่งพบเพียงประมาณร้อยละ 25 ถึง 35 ของประชากรทั่วไป ในขณะที่อาสาสมัครที่มี HLA แบบอื่นมีการตอบสนองของแอนติบอดีในระดับต่ำ²⁹¹ อย่างไรก็ตามผู้ที่มีการสร้างแอนติบอดีในระดับที่สูงจะพบการตอบสนองของ CD4+ T cell ผ่านทาง Th1 ชัดเจน และแอนติบอดีที่เกิดขึ้นเป็นชนิด IgG1 และ IgG3 ทั้งนี้การใช้ adjuvant QS21 จะทำให้การตอบสนองต่อวัคซีนมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ Alum เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ในการทดสอบซ้ำในอาสาสมัครกลุ่มอื่นพบว่าผลของวัคซีนยังคงเป็นเช่นเดิม เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ซีรัมจากผู้ได้รับวัคซีนให้ทำปฏิกิริยากับ sporozoite พบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ NANP ที่เกิดขึ้นสามารถเกิด cross-link ที่ผิวของ

sporozoite ในลักษณะของ precipitin ที่ส่วนท้ายของ sporozoite ซึ่งเป็นการทำลาย sporozoite ในที่สุด²⁹¹

3.1.1.2 วัคซีน (T1BT*)₄-P3C ประกอบด้วย เปปไทด์ T1B เชื่อมกับ universal T cell epitope หรือ CST.3 epitope ที่อยู่ทางด้าน C-terminus ของโปรตีน CS ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ 20 ตัว²⁹² ดังนั้นแต่ละแขนงของเปปไทด์มีกรดอะมิโน 48 ตัว เชื่อมกับ lysine ที่ทำหน้าที่เป็นแกนกลาง ด้วยพันธะ oxime ซึ่งมีทั้งสิ้น 4 แขน โดยแกนกลางดังกล่าวจะถูกปรับเปลี่ยนด้วย lipopeptide palmitoyl-S-glyceryl cysteine (P3C) ซึ่งทำหน้าที่เป็น Toll-like receptor 2 (TLR2) agonist ซึ่ง TLR-2 เป็นโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์หลายชนิด ทำหน้าที่ตรวจสอบหาสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะจุลชีพก่อโรคต่างๆ และส่งสัญญาณไปยังเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนองต่อไป ดังนั้น P3C จึงทำหน้าที่เป็น adjuvant ดังนั้นวัคซีน (T1BT*)₄-P3C จึงไม่จำเป็นต้องใช้ adjuvant อื่น โดยสามารถกระตุ้นหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ tetrapeptide repeats และ sporozoite ได้ในระดับที่สูงและอยู่ได้นาน การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน Phase I พบว่าอาสาสมัครส่วนใหญ่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติในการทำลาย sporozoite ได้ดีและอยู่ได้นานเช่นกัน และยังพบว่ามีการตอบสนองของ CD4+ T cell ในระดับที่สูง สอดคล้องกับการตอบสนองของแอนติบอดีซึ่งส่วนใหญ่เป็น IgG1 และ IgG3 รวมทั้งการพบการหลั่ง IFN- γ ในระดับที่สูง และพบการตอบสนองของ CD4+ memory T cell ที่จำเพาะต่อ T cell epitope ในวัคซีนได้ดี ดังนั้นการสังเคราะห์เปปไทด์ที่มีองค์ประกอบและโครงสร้างที่เหมาะสม สามารถใช้เป็นวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้น CD4+ T cell ได้ดีทัดเทียมกับการใช้ sporozoite ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์เป็นวัคซีน^{291,293}

3.1.2 วัคซีนที่มีองค์ประกอบของเปปไทด์เป็นสายตรง (linear peptide vaccines)

3.1.2.1 วัคซีน 48 mers linear T1BT* peptide เนื่องจากการสังเคราะห์เปปไทด์ที่ซับซ้อนดังกล่าวข้างต้นในปริมาณมากมีข้อจำกัด ดังนั้นจึงมีการทดลองใช้เปปไทด์สายตรงที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 48 ตัว ในลักษณะ

T1BT* ร่วมกับ Montanide ISA720 เป็น adjuvant หนูทดลองที่ได้รับวัคซีนดังกล่าวสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ repeats ในโปรตีน CS และทำปฏิกิริยากับ sporozoite ได้อย่างมีคุณภาพ อย่างไรก็ตามพบว่าแอนติบอดีที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่เกิดจากการกระตุ้นผ่าน Th2 เป็นชนิด IgG1 ซึ่งไม่มีคุณสมบัติ opsonization ดังนั้นแอนติบอดีดังกล่าวจึงอาจมีผลต่อ sporozoite โดยตรง อย่างไรก็ตามการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนจากเปปไทด์ในรูปแบบนี้ยังมีอยู่อย่างจำกัดและยังไม่มีการศึกษาต่อในอาสาสมัคร²⁹¹

3.1.2.2 วัคซีนเปปไทด์สังเคราะห์สายยาวที่มีกรดอะมิโนทางด้าน C-terminus ของโปรตีน CS (long synthetic peptides, CS LSP vaccine) นอกจากบทบาทของแอนติบอดีในการทำลาย sporozoite แล้ว การทำลายเชื้อมาลาเรียระยะที่อยู่ในตับมีบทบาทสำคัญต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย โดยอาศัย CD8+ T cells และ cytokines ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IFN- γ ซึ่งวัคซีน CS LSP มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบที่มีความยาวมากกว่า 100 ตัว โดยลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวครอบคลุม T cell epitopes ในส่วน C-terminus ของโปรตีน CS เมื่อทำการทดลองฉีดวัคซีนดังกล่าวในหนูพบว่ามีการกระตุ้น CD8+ cytotoxic T lymphocytes ที่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายที่มีโปรตีน CS อยู่ภายใน รวมทั้งมีการสร้าง IFN- γ ในปริมาณมากหัดเทียบกับการฉีดวัคซีนที่มี sporozoite ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์เป็นองค์ประกอบ และหนูเหล่านี้มีภูมิคุ้มกันต่อการทดสอบการติดเชื้อ sporozoite ได้ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน CS LSP ในอาสาสมัคร phase I พบว่ามีการกระตุ้น CD8+ T cell ที่จำเพาะต่อโปรตีน CS ของ *P.falciparum* อย่างชัดเจน ดังนั้นแนวโน้มในการพัฒนาวัคซีนโดยใช้เปปไทด์สังเคราะห์เป็นองค์ประกอบจึงมีความเป็นไปได้ในเชิงประสิทธิภาพของวัคซีนในอนาคต²⁹¹

3.2 erythrocytic stage peptide vaccines เนื่องจากแอนติเจนที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนที่มีผลต่อระยะที่เชื้อมาลาเรียเจริญโดยไม่อาศัยเพศมีหลายชนิด ด้วยกลไกการทำลายเชื้อที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามแอนติเจนในกลุ่มนี้ที่ได้รับการพัฒนาในรูป

ของเปปไทด์สังเคราะห์และมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องถึงระดับการทดลอง phase I ในอาสาสมัครมี 2 ชนิด ดังนี้

3.2.1 วัคซีนเปปไทด์สังเคราะห์สายยาวจาก glutamate-rich protein (GLURP LSP vaccine) มีองค์ประกอบกรดอะมิโนจากด้าน N-terminus ของโปรตีน GLURP ซึ่งมีความคงที่ในทุกสายพันธุ์ของ *P.falciparum* และมี B cell epitopes เป็นองค์ประกอบ โดยสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีชนิด IgG1 และ IgG3 ที่มีบทบาทในกระบวนการ antibody dependent cellular inhibition หรือ ADICI ทั้งนี้แอนติบอดีต่อ GLURP ไม่สามารถยับยั้งกระบวนการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดง แต่ทำหน้าที่ร่วมกับ monocyte ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย เช่นเดียวกับที่พบในการนำเชื้อจากผู้มี clinical immunity ต่อมาลาเรีย จากการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน GLURP LSP โดยใช้ Alum หรือ Montanide ISA720 เป็น adjuvant พบว่าวัคซีนดังกล่าวมีความปลอดภัยและสามารถกระตุ้นการตอบสนองของ T cell และ B cell ต่อโปรตีนดังกล่าวในระดับที่สูง ตลอดจนพบการสร้าง IFN- γ จาก mononuclear cells ในกระแสเลือด ทั้งนี้แอนติบอดีที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็น IgG1 ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย โดยกระบวนการ ADICI ดังนั้นวัคซีนดังกล่าวจึงมีศักยภาพในการพัฒนาต่อไป²⁹⁴⁻²⁹⁶

3.2.2 วัคซีนเปปไทด์สังเคราะห์สายยาวจาก merozoite surface protein-3 (MSP3 LSP vaccine) จากการวิเคราะห์การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ที่มี clinical immunity พบว่า ในส่วน C-terminus ของ PfMSP-3 มีลำดับกรดอะมิโน 70 ตัว ที่มีคุณสมบัติเป็น B cell epitopes สำหรับแอนติบอดีชนิด IgG1 และ IgG3 และ T cell epitopes ชนิด Th1 ดังนั้นจึงใช้บริเวณดังกล่าวผลิตเปปไทด์สังเคราะห์ เพื่อเป็นองค์ประกอบของวัคซีน MSP3 LSP โดยใช้ Alum หรือ Montanide ISA720 เป็น adjuvant พบว่าวัคซีนที่มี Alum เป็น adjuvant ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงในบริเวณที่ฉีดวัคซีน ในขณะที่ให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ MSP3 การตอบสนองของ T cell และการสร้าง IFN- γ ได้ดี

ตัดเทียบกับการใช้ Montanide ISA720 เป็น adjuvant ซึ่งแอนติบอดีที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะต่อ MSP3 และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้ด้วยกลไก ADCl เช่นเดียวกับที่พบในอาสาสมัครที่ได้รับวัคซีน GLURP LSU ดังกล่าวข้างต้น²⁹⁷⁻²⁹⁹

3.3 multistage malaria peptide vaccines วัตถุประสงค์ของการใช้แอนติเจนจากหลายระยะของเชื้อมาลาเรียเพื่อเป็นองค์ประกอบของวัคซีนนั้น เพื่อให้การตอบสนองของผู้ได้รับวัคซีนมีผลต่อการควบคุมหรือทำลายเชื้อได้หลายระยะ โดยคาดว่าประสิทธิภาพของวัคซีนจะดีกว่าการใช้แอนติเจนเพียงชนิดเดียว วัคซีนที่ได้รับการพัฒนาในกลุ่มนี้ที่สำคัญมี 2 ประเภทดังนี้

3.3.1 SPf66 vaccine เป็นโพลีเมอร์ของเปปไทด์สังเคราะห์ ประกอบด้วย tetrapeptide repeats (NANP) จากโปรตีน CS เชื่อมกับบางส่วนของโปรตีน MSP1 และโปรตีนอีก 2 ชนิดที่มีขนาด 35 และ 55 กิโลดาลตัน แม้ว่าผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในลิงจะให้ผลการป้องกันโรคมาลาเรียในบางส่วน รวมทั้งการทดลองในคนตั้งแต่ phase I ถึง III ในอเมริกาใต้ให้ผลการป้องกันโรคประมาณร้อยละ 30 ของประชากรที่ได้รับวัคซีน แต่จากการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนดังกล่าวในแอฟริกา และประเทศไทยกลับพบว่าวัคซีน SPf66 ไม่ให้ผลการป้องกันโรคมาลาเรียเลย³⁰⁰⁻³⁰²

3.3.2 malaria peptide virosomes การพัฒนาวัคซีนชนิดนี้อาศัย virosomes ซึ่งเป็น unilamellar liposomal vesicles ขนาด 150 นาโนเมตรที่ประกอบด้วย hemagglutinin (HA) glycoproteins ของไวรัส influenza บนผิวของ virosome ซึ่งจะช่วยให้การนำเสนอแอนติเจนเข้าสู่ antigen presenting cells ได้ง่ายและมีประสิทธิภาพดี ดังนั้น virosomes จึงทำหน้าที่เป็นทั้งตัวนำส่งโปรตีนหรือ protein carrier และเป็น adjuvant³⁰³⁻³⁰⁵ วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียประเภทนี้มีองค์ประกอบของเปปไทด์ของโปรตีน CS และ semi-conserved domain III ของ apical membrane antigen 1 หรือ AMA1 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 49 ตัว ร่วมกับ phosphatidylethanolamine บรรจุใน virosomes ดังกล่าว จากการศึกษาในอาสาสมัคร

พบว่าวัคซีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้อาสาสมัครสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน CS และมีผลยับยั้งการลุกลามของ sporozoite เข้าสู่เซลล์ตับได้ประมาณร้อยละ 44 และแอนติบอดีดังกล่าวอยู่ได้นานถึง 1 ปี หลังจากการฉีดวัคซีน 3 ครั้ง ในเดือนที่ 0, 2 และ 6 ในขณะที่เดียวกันผู้ได้รับวัคซีนดังกล่าวส่วนหนึ่งสามารถสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน AMA-1 นอกจากนี้ยังพบว่าการตอบสนองของแอนติบอดีต่อโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่มีโปรตีนชนิดเดียวเป็นองค์ประกอบหรือกลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน^{306,307}

การพัฒนาวัคซีนโดยใช้เปปไทด์เป็นองค์ประกอบของวัคซีนได้รับการพัฒนาอย่างมากในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาทั้งในด้านโครงสร้างของเปปไทด์ การเลือกใช้ adjuvant ที่เหมาะสม การตรวจสอบและประเมินประสิทธิภาพของการตอบสนองของผู้ได้รับวัคซีนต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียอย่างเป็นระบบ ได้นำมาซึ่งองค์ความรู้ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวัคซีนรูปแบบนี้ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นในอนาคต

การควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทยกับผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนในอนาคต

การควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทยซึ่งดำเนินการโดยกระทรวงสาธารณสุขได้ใช้มาตรการต่างๆร่วมกัน ตั้งแต่เฝ้าระวังโรค โดยการตรวจหาผู้ป่วยทางตรง (active case detection) การค้นหาผู้ป่วยทางอ้อม (passive case detection) การให้การวินิจฉัยและรักษาในระยะแรกของการติดเชื้อโดยการกระจายสถานบริการครอบคลุมทุกพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย การเฝ้าระวังการดื้อยา การสอบสวนแหล่งแพร่เชื้อ การกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงพาหะ การใช้มุ้งชุบยาฆ่าแมลง และมาตรการอื่นๆ ร่วมกัน ส่งผลให้จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียในประเทศไทยลดลงอย่างมากในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ทั้งนี้การแพร่กระจายของโรคมาลาเรียในประเทศไทยยังคงเป็นปัญหาตามชายแดนระหว่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไทยและพม่า อย่างไรก็ตามในช่วง 5 ปีที่ผ่านมาจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียบริเวณชายแดน

ไทยและมาเลเซียกลับเพิ่มสูงขึ้นหลังจากการลดลงอย่างมากในช่วงก่อนหน้านี้ ในขณะที่จำนวนผู้ป่วยบริเวณชายแดนไทยและพม่าโดยเฉพาะในบริเวณจังหวัดตากมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างโปรตีนที่มีศักยภาพเป็นองค์ประกอบของวัคซีน ได้แก่ PvAMA1, PvMSP1, PvMSP4, PvMSP5, PfCSP และ PfMSP2 โดยเปรียบเทียบประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตากและจากจังหวัดยะลาและนราธิวาส พบว่า ประชากร *P.falciparum* และ *P.vivax* มีความหลากหลายสูง¹⁸⁴ ในขณะที่ประชากรเชื้อมาลาเรียทั้งสองชนิดจากจังหวัดยะลาและนราธิวาสมีความหลากหลายต่ำมาก ทั้งที่พบว่าจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นจากเดิมในช่วง 5 ปีที่ผ่านมาอย่างชัดเจน ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมประชากรพบว่าสาเหตุการพบความหลากหลายของยีนที่สร้างโปรตีนที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนเหล่านี้มีค่าต่ำโดยพบเพียงไม่กี่รูปแบบนั้น เกิดจากภาวะคอขวด (bottleneck effect)¹⁸⁴ อันเป็นผลจากการควบคุมโรคที่ดีในอดีต การเพิ่มขึ้นของจำนวนผู้ป่วยในช่วง 5 ปีหลังอันเนื่องมาจากการควบคุมโรคในพื้นที่เหล่านี้มีข้อจำกัดจากปัจจัยความปลอดภัยของเจ้าหน้าที่และประชากรในพื้นที่ทำให้จำนวนผู้ป่วยกลับเพิ่มขึ้น ในทางตรงข้ามประชากรเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตากยังคงความหลากหลายในระดับสูงนั้นมีหลายปัจจัย รวมทั้งปัญหาการเคลื่อนย้ายประชากรระหว่างพรมแดนของประเทศทำให้เชื้อมาลาเรียมีโอกาสเกิด intragenic recombination ส่งผลให้ความหลากหลายของยีนเหล่านี้คงอยู่ในระดับสูง ประชากรเชื้อมาลาเรียที่มียีนที่มีความหลากหลายต่ำย่อมไม่เป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาวัคซีนในขณะที่เชื้อมาลาเรียที่มีความหลากหลายสูงย่อมเป็นอุปสรรคต่อประสิทธิภาพของวัคซีน ดังนั้นประสิทธิภาพของวัคซีนจะดีขึ้นต้องมีการควบคุมโรคมาลาเรียด้วยมาตรการอื่นๆ อย่างได้ผลเพื่อให้เกิดภาวะคอขวดในประชากรของเชื้อมาลาเรียอันจะเอื้อประโยชน์ต่อประสิทธิภาพของวัคซีนในอนาคต¹⁸⁴

เอกสารอ้างอิง

1. Coluzzi M. The clay feet of the malaria giant and its African roots: hypotheses and inferences about origin, spread and control of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia*. 1999;41:277-83.
2. Hoeppli R. Parasites and parasitic infections in early medicine and science. Singapore: University of Malaya;1959.
3. Russell PF. Man's mastery of malaria. London: Oxford University Press; 1955.
4. Sallares R, Bouwman A, Anderlung C. The spread of malaria to southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. *Med Hist*. 2004;48:311-28.
5. Garnham PCC. Malaria parasites and other Haemosporidia. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1966.
6. Jones WHS. Malaria and Greek history. Manchester: Manchester University Press; 1909.
7. Hackett LW. Malaria in Europe. London: Oxford University Press; 1937.
8. Cox FEG. Illustrated history of tropical diseases. London: The Wellcome Trust; 1996.
9. WHO [Internet]. Global malaria report 2010. Available from: http://www.who.int/malaria/world_malaria.report.2010/en/index.html.
10. Cui L, Yan G, Sattabongkot J, Cao Y, Chen B, Chen X, et al. Malaria in the Greater Mekong Subregion: Heterogeneity and complexity. *Acta Trop*. 2011. (in press)
11. Zhou G, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Jones J, Bjrnstad ON, Yan G, et al. Spatio-temporal distribution of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72:256-62.
12. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki

- T, Sata T, Kanbara H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:2211-3.
13. Putaporntip C, Hongsrimuang T, Seethamchai S, Kobasa T, Limkittikul K, Cui L, et al. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. *J Infect Dis*. 2009;199:1143-50.
14. Sinden RE and Gilles HM. The malaria parasites. In: Warrell DA, Gilles HM, ed. *Essential malariology*. 4th ed. London: Arnold; 2002. p.8-34.
15. Rosenberg R and Rungsiwongse J. The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45:574-7.
16. Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, et al. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1982;31:1291-3.
17. Krotoski WA. The hypnozoite and malarial relapse. *Prog Clin Parasitol*. 1989;1:1-19.
18. Moore LR, Fujioka H, Williams PS, Chalmers JJ, Grimberg B, Zimmerman PA, et al. Hemoglobin degradation in malaria-infected erythrocytes determined from live cell magnetophoresis. *FASEB J*. 2006;20:747-9.
19. Goldberg DE and Slater AF. The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. *Parasitol Today*. 1992;8:280-3.
20. Grobusch MP and Kremsner PG. Uncomplicated malaria. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;295:83-104.
21. Roberts DJ, Casals-Pascual C, Weatherall DJ. The clinical and pathophysiological features of malarial anaemia. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;295:137-67.
22. Sinden RE. The cell biology of sexual development in *Plasmodium*. *Parasitology*. 1983;86:7-28.
23. Dyer M and Day KP. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*. 2000;16:102-7.
24. Talman AM, Domarle O, McKenzie FE, Ariey F, Robert V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2004;3:24.
25. Suwonkerd W, Tsuda Y, Overgaard HJ, Chawprom S, Tuno N, Prajakwong S, et al. Changes in malaria vector densities over a twenty-three year period in Mae Hong Son Province, northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2004;35:316-24.
26. World Health Organization. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94 (Suppl 1):S1-90.
27. Warrell DA, Looareesuwan S, Warrell MJ, Kasemsarn P, Intaraprasert R, Bunnag D, et al. Dexamethasone proves deleterious in cerebral malaria. A double-blind trial in 100 comatose patients. *N Engl J Med*. 1982;306:313-9.
28. Severe and complicated malaria. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990;84(Suppl 2):1-65.
29. Phillips RE, Looareesuwan S, Warrell DA, Lee SH, Karbwang J, Warrell MJ, et al. The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *Q J Med*. 1986;58:305-23.
30. Weber MW, B?ker K, Horstmann RD, Ehrich JH. Renal failure is a common complication in non-immune Europeans with *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Parasitol*. 1991;42:115-8.
31. Phillips RE, White NJ, Looareesuwan

- S, Chanthavanit P, Karbwang J, Warrell DA. Acute renal failure in falciparum malaria in eastern Thailand: successful use of peritoneal dialysis. XI International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Calgary, Canada; 1984. p.6-11
32. Brooks MH, Kiel FW, Sheehy TW, Barry KG. Acute pulmonary edema in falciparum malaria. *N Engl J Med.* 1968;279:732-7.
33. Hall AP, Charoendhum D, Sonkom P. Pulmonary oedema due to fluid overload in falciparum malaria. Annual Progress Report, SEATO Medical Research Laboratory, Bangkok, Thailand, April 1974-March 1975;1975. p.226-33.
34. White NJ. Pathophysiology. *Clinics Trop Med Com Dis.* 1986;1:55-90.
35. White NJ. The pharmacokinetics of quinine and quinidine in malaria. *Acta Leiden.* 1987;55:65-76.
36. Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Fletcher KA, Morris K. Blood glucose levels in Malawian children before and during the administration of intravenous quinine for severe falciparum malaria. *N Engl J Med.* 1988;319:1040-7.
37. White NJ, Warrell DA, Chanthavanich P, Looareesuwan S, Warrell MJ, Krishna S, et al. Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in falciparum malaria. *N Engl J Med.* 1983; 309:61-6.
38. Looareesuwan S, Phillips RE, White NJ, Kietinun S, Karbwang J, Rackow C, et al. Quinine and severe falciparum malaria in late pregnancy. *Lancet.* 1985;2:4-8.
39. Srichaikul T, Leelasiri A, Polvicha P, Mongkongsritagoon W, Prayoonwivat W, Leelarsupasri S, et al. Exchange transfusion therapy in severe complicated malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1993;24:100-5.
40. Taylor TE, Borgstein A, Molyneux ME. Acid-base status in paediatric *Plasmodium falciparum* malaria. *Q J Med.* 1993;86:99-109.
41. Marsh K, Forster D, Waruiru C, Mwangi I, Winstanley M, Marsh V, et al. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med.* 1995;332:1399-404.
42. Waller D, Krishna S, Crawley J, Miller K, Nosten F, Chapman D, et al. Clinical features and outcome of severe malaria in Gambian children. *Clin Infect Dis.* 1995;21:577-87.
43. Vachon F, Fajac I, Gachot B, Coulaud JP, Charmot G. Halofantrine and acute intravascular haemolysis. *Lancet.* 1992;340:909-10.
44. Mojon M, Wallon M, Gravey A, Peaud PY, Sartre J, Peyron F. Intravascular haemolysis following halofantrine intake. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88:91.
45. Gilles HM, Ikeme AC. Haemoglobinuria among adult Nigerians due to glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency with drug sensitivity. *Lancet.* 1960;2:889-91.
46. Wilairatana P, Looareesuwan S, Charoenlarp P. Liver profile changes and complications in jaundiced patients with falciparum malaria. *Trop Med Parasitol.* 1994;45:298-302.
47. Patel CC. Acute febrile encephalopathy in Ugandan children. *Afr J Med Sci.* 1971;2:127-34.
48. Looareesuwan S, Phillips RE, White NJ, Karbwang J, Benjasurat Y, Attanath P, et al. Intravenous amodiaquine and oral amodiaquine/erythromycin in the treatment of chloroquine-resistant falciparum malaria. *Lancet.* 1985;2:805-8.
49. สมชาย จงวุฒิเวศย์. การวินิจฉัยภัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ. ใน: สมชาย จงวุฒิเวศย์ และ อุษา ทิส

ยากร, บรรณาธิการ. มาลาเรีย 2549. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์บริษัทธนาเพชร; 2549. น.281-303.

50. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 2006; 28:51-60.

51. Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med.* 1999;5:340-43.

52. Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, et al. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:65-76.

53. Baird JK, Purnomo, Basri H, Bangs MJ, Andersen EM, Jones TR, et al. Age-specific prevalence of *Plasmodium falciparum* among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49:707-19.

54. Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* 1961;192:733-7.

55. Edozien JC, Gilles HM, Udeozo IK. Adult and cord-blood gamma-globulin and immunity to malaria in Nigerians. *Lancet.* 1962;2:951-5.

56. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:297-308.

57. Mulligan HW, Russell PF, Mohan BN. Active immunization of fowls against *Plasmodium gallinaceum* by injections of killed homologous sporozoites. *J Malaria Inst India.* 1941;4:25-34.

58. Russell P, Mohan BN. The immunization

of fowls against mosquito-borne *Plasmodium gallinaceum* by injections of serum and of inactivated homologous sporozoites. *J Exp Med.* 1942;76:477-92

59. Nussenzweig R, Vanderberg J, Most H. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. IV. Dose response, specificity and humoral immunity. *Mil Med.* 1969;134:1176-82.

60. Vanderberg J, Nussenzweig R, Most H. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. V. In vitro effects of immune serum on sporozoites. *Mil Med.* 1969;134:1183-90.

61. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest.* 2010;120:4168-78.

62. Sinnis P, Zavala F. The skin stage of malaria infection: biology and relevance to the malaria vaccine effort. *Future Microbiol.* 2008;3:275-8.

63. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:18640-5.

64. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med.* 2006;12:220-4.

65. McCutchan TF, Kissinger JC, Touray MG, Rogers MJ, Li J, Sullivan M, et al. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: biological and phylogenetic implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:11889-94.

66. Jongwutiwes S, Tanabe K, Hughes MK, Kanbara H, Hughes AL. Allelic variation in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*

from Thai field isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:659-68.

67. Hollingdale MR, Nardin EH, Tharavanij S, Schwartz AL, Nussenzweig RS. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. *J Immunol.* 1984;132:909-13.

68. Nardin EH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Collins WE, Harinasuta KT, Tapchaisri P, et al. Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *J Exp Med.* 1982;156:20-30.

69. Potocnjak P, Yoshida N, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J Exp Med.* 1980;151:1504-13.

70. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv Immunol.* 1989;45:283-334.

71. Stewart MJ, Nawrot RJ, Schulman S, Van derberg JP. *Plasmodium berghei* sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. *Infect Immun.* 1986;51:859-64.

72. Good MF, Maloy WL, Lunde MN, Margalit H, Cornette JL, Smith GL, et al. Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science.* 1987;235:1059-62.

73. De La Cruz VF, Maloy WL, Miller LH, Good MF, McCutchan TF. The immunologic significance of variation within malaria circumsporozoite protein sequences. *J Immunol.* 1989;142:3568-75.

74. Malik A, Egan JE, Houghten RA, Sadoff JC, Hoffman SL. Human cytotoxic T lymphocytes against

the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:3300-404.

75. Zevering Y, Houghten RA, Frazer IH, Good MF. Major population differences in T cell response to a malaria sporozoite vaccine candidate. *Int Immunol.* 1990;2:945-55.

76. Doolan DL, Houghten RA, Good MF. Location of human cytotoxic T cell epitopes within a polymorphic domain of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Int Immunol.* 1991;3:511-16.

77. Lockyer MJ, Marsh K, Newbold CI. Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;37:275-80.

78. Plebanski M, Lee EA, Hannan CM, Flanagan KL, Gilbert SC, Gravenor MB, et al. Altered peptide ligands narrow the repertoire of cellular immune responses by interfering with T-cell priming. *Nat Med.* 1999;5:565-71.

79. Kumkhaek C, Phra-ek K, Singhasivanon P, Looareesuwan S, Hirunpetcharat C, Brockman A, et al. A survey of the Th2R and Th3R allelic variants in the circumsporozoite protein gene of *P. falciparum* parasites from western Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2004;35:281-7.

80. Hoffman SL, Cannon LT Sr, Berzofsky JA, Majarian WR, Young JF, Maloy WL, et al. *Plasmodium falciparum*: sporozoite boosting of immunity due to a T-cell epitope on a sporozoite vaccine. *Exp Parasitol.* 1987;64:64-70.

81. Hoffman SL, Oster CN, Plowe CV, Woollett GR, Beier JC, Chulay JD, et al. Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. *Science.* 1987;

237:639-42.

82. Schofield L. On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitol Today*. 1991;7:99-105.

83. Weiss WR, Sedegah M, Beaudoin RL, Miller LH, Good MF. CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:573-6.

84. Kwiatkowski D, Marsh K. Development of a malaria vaccine. *Lancet*. 1997;350:1696-701.

85. Charoenvit Y, Leef MF, Yuan LF, Sedegah M, Beaudoin RL. Characterization of *Plasmodium yoelii* monoclonal antibodies directed against stage-specific sporozoite antigens. *Infect Immun*. 1987;55:604-08.

86. Robson KJ, Hall JR, Jennings MW, Harris TJ, Marsh K, Newbold CI, et al. A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature*. 1988;335:79-82.

87. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Kanbara H, Tanabe K. Variation in the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. *Mol Biochem Parasitol*. 1998;92:349-53.

88. Robson KJ, Dolo A, Hackford IR, Doumbo O, Richards MB, Keita MM, et al. Natural polymorphism in the thrombospondin-related adhesive protein of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58:81-9.

89. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tia T, Ferreira MU, Kanbara H, Tanabe K. Diversity in the thrombospondin-related adhesive protein gene (TRAP) of *Plasmodium vivax*. *Gene*. 2001;268:97-104.

90. Sinnis P, Nardin E. Sporozoite antigens:

biology and immunology of the circumsporozoite protein and thrombospondin-related anonymous protein. *Chem Immunol*. 2002;80:70-96.

91. Rogers WO, Malik A, Mellouk S, Nakamura K, Rogers MD, Szarfman A, et al. Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:9176-80.

92. Charoenvit Y, Collins WE, Jones TR, Millet P, Yuan L, Campbell GH, et al. Inability of malaria vaccine to induce antibodies to a protective epitope within its sequence. *Science*. 1991;251:668-71.

93. Khusmith S, Charoenvit Y, Kumar S, Sedegah M, Beaudoin RL, Hoffman SL. Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science*. 1991;252:715-8.

94. Suwancharoen C, Putaporntip C, Rungruang T, Jongwutiwes S. Naturally acquired IgG antibodies against the C-terminal part of *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein in a low endemic area. *Parasitol Res*. 2011. (in press)

95. Bottius E, BenMohamed L, Brahimi K, Gras H, Lepers JP, Raharimalala L, et al. A novel *Plasmodium falciparum* sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper, and CTL epitopes. *J Immunol*. 1996;156:2874-84.

96. Templeton TJ, Kaslow DC. Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;84:13-24.

97. Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy*. 1988;41:72-97.

98. McBride JS, Newbold CI, Anand R.

Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J Exp Med. 1985;161:160-80.

99. Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J Mol Biol. 1987;195:273-87.

100. Jongwutiwes S, Tanabe K, Nakazawa S, Yanagi T, Kanbara H. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in P190 (MSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. Mol Biochem Parasitol. 1992;51:81-9.

101. Kerr PJ, Ranford-Cartwright LC, Walliker D. Proof of intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 1994;66:241-8.

102. Conway DJ, Roper C, Oduola AM, Arnot DE, Kremsner PG, Grobusch MP, et al. High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:4506-11.

103. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol Biol Evol. 2000;17:1467-82.

104. Locher CP, Tam LQ, Chang SP, McBride JS, Siddiqui WA. *Plasmodium falciparum*: gp195 tripeptide repeat-specific monoclonal antibody inhibits parasite growth in vitro. Exp Parasitol. 1996;84:74-83.

105. Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, et al. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. J Infect Dis. 1996;173:765-9.

106. Blackman MJ, Holder AA. Use of a

recombinant baculovirus product to measure naturally-acquired human antibodies to disulphide-constrained epitopes on the *P. falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1). FEMS Immunol Med Microbiol. 1993;6:307-15.

107. Kumar S, Epstein JE, Richie TL, Nkrumah FK, Soisson L, Carucci DJ, et al. A multilateral effort to develop DNA vaccines against falciparum malaria. Trends Parasitol. 2002;18:129-35.

108. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. 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. 1990;172:379-82.

109. Siddiqui WA, Tam LQ, Kramer KJ, Hui GS, Case SE, Yamaga KM, et al. Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:3014-8.

110. Cheung A, Leban J, Shaw AR, Merkli B, Stocker J, Chizzolini C, et al. Immunization with synthetic peptides of a *Plasmodium falciparum* surface antigen induces antimerozoite antibodies. Proc Natl Acad Sci USA. 1986;83:8328-32.

111. Herrera S, Herrera MA, Perlaza BL, Burki Y, Caspers P, D'beli H, et al. Immunization of Aotus monkeys with *Plasmodium falciparum* blood-stage recombinant proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87:4017-21.

112. Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B, et al. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. Parasite Immunol. 1992;14:321-37.

113. Collins WE, Kaslow DC, Sullivan JS, Morris CL, Galland GG, Yang C, et al. Testing the efficacy of a recombinant merozoite surface protein (MSP-1(19) of *Plasmodium vivax* in *Saimiri boliviensis* monkeys. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:350-6.
114. Yang C, Collins WE, Sullivan JS, Kaslow DC, Xiao L, Lal AA. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. *Infect Immun.* 1999;67:342-9
115. Mertens F, Levitus G, Camargo LM, Ferreira MU, Dutra AP, Del Portillo HA. Longitudinal study of naturally acquired humoral immune responses against the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in patients from Rondonia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49:383-92.
116. Levitus G, Mertens F, Speranca MA, Camargo LM, Ferreira MU, del Portillo HA. Characterization of naturally acquired human IgG responses against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:68-76.
117. Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop.* 1999;72:13-24.
118. Ak M, Jones TR, Charoenvit Y, Kumar S, Kaslow DC, Maris D, et al. Humoral immune responses against *Plasmodium vivax* MSP1 in humans living in a malaria endemic area in Flores, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1998;29:685-91.
119. Rodriguez LE, Urquiza M, Ocampo M, Curtidor H, Suarez J, Garcia J, et al. *Plasmodium vivax* MSP-1 peptides have high specific binding activity to human reticulocytes. *Vaccine.* 2002;20:1331-9.
120. Espinosa AM, Sierra AY, Barrero CA, Cepeda LA, Cantor EM, Lombo TB, et al. Expression, polymorphism analysis, reticulocyte binding and serological reactivity of two *Plasmodium vivax* MSP-1 protein recombinant fragments. *Vaccine.* 2003;21:1033-43.
121. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, et al. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:16348-53.
122. Fenton B, Clark JT, Wilson CF, McBride JS, Walliker D. Polymorphism of a 35-48 kDa *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;34:79-86.
123. Smythe JA, Coppel RL, Day KP, Martin RK, Oduola AM, Kemp DJ, et al. Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:1751-5.
124. Fenton B, Clark JT, Khan CM, Robinson JV, Walliker D, Ridley R, et al. Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol.* 1991;11:963-71.
125. Marshall VM, Coppel RL, Martin RK, Oduola AM, Anders RF, Kemp DJ. A *Plasmodium falciparum* MSA-2 gene apparently generated by intragenic recombination between the two allelic families. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;45:349-51.
126. Felger I, Tavul L, Kabintik S, Marshall V, Genton B, Alpers M, et al. *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface antigen

2 alleles in an area with endemic malaria in Papua New Guinea. *Exp Parasitol.* 1994;79:106-16.

127. Epping RJ, Goldstone SD, Ingram LT, Upcroft JA, Ramasamy R, Cooper JA, et al. An epitope recognised by inhibitory monoclonal antibodies that react with a 51 kilodalton merozoite surface antigen in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1988;28:1-10.

128. Lyon JA, Thomas AW, Hall T, Chulay JD. Specificities of antibodies that inhibit merozoite dispersal from malaria-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;36:77-85.

129. Ocampo M, Urquiza M, Guzmán F, Rodriguez LE, Suarez J, Curtidor H, et al. Two MSA 2 peptides that bind to human red blood cells are relevant to *Plasmodium falciparum* merozoite invasion. *J Pept Res.* 2000;55:216-23.

130. Eisen D, Billman-Jacobe H, Marshall VF, Fryauff D, Coppel RL. Temporal variation of the merozoite surface protein-2 gene of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 1998;66:239-46.

131. al-Yaman F, Genton B, Anders RF, Falk M, Triglia T, Lewis D, et al. Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:593-602.

132. Polley SD, Conway DJ, Cavanagh DR, McBride JS, Lowe BS, Williams TN, et al. High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya. *Vaccine.* 2006;24:4233-46.

133. McColl DJ, Anders RF. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the

Plasmodium falciparum merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Mol Biochem Parasitol.* 1997;90:21-31.

134. McColl DJ, Silva A, Foley M, Kun JF, Favaloro JM, Thompson JK, et al. Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;68:53-67.

135. Galinski MR, Ingravallo P, Corredor-Medina C, Al-Khedery B, Pova M, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3beta and-3gamma share structural similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3alpha and define a new gene family. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;115:41-53.

136. Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Druilhe P. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect Immun.* 2000;68:2617-20.

137. Good MF, Kaslow DC, Miller LH. Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:57-87.

138. Marshall VM, Coppel RL. Characterisation of the gene encoding adenylosuccinate lyase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;88:237-41.

139. Wang L, Marshall VM, Coppel RL. Limited polymorphism of the vaccine candidate merozoite surface protein 4 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;120:301-3.

140. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Friedman R, Hughes AL. The extent of nucleotide polymorphism is highly variable across a 3-kb region on *Plasmodium falciparum* chromosome 2. *Mol Biol Evol.* 2002;19:1585-90.

141. Polson HE, Conway DJ, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O, Longacre S. Gene polymorphism of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins 4 and 5. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;142:110-5.
142. Kedzierski L, Black CG, Coppel RL. Immunization with recombinant *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 protects mice against lethal challenge. *Infect Immun.* 2000;68:6034-7.
143. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Ferreira MU, Kanbara H, Udomsangpetch R, Cui L. Limited global diversity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 4 gene. *Infect Genet Evol.* 2009;9:821-6.
144. Putaporntip C, Udomsangpetch R, Pattanawong U, Cui L, Jongwutiwes S. Genetic diversity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-5 locus from diverse geographic origins. *Gene.* 2010;456:24-35.
145. Kedzierski L, Black CG, Stowers AW, Goschnick MW, Kaslow DC, Coppel RL. Comparison of the protective efficacy of yeast-derived and *Escherichia coli*-derived recombinant merozoite surface protein 4/5 against lethal challenge by *Plasmodium yoelii*. *Vaccine.* 2001;19:4661-8.
146. Narum DL, Thomas AW. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;67:59-68.
147. Crewther PE, Culvenor JG, Silva A, Cooper JA, Anders RF. *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp Parasitol.* 1990;70:193-206.
148. Triglia T, Healer J, Caruana SR, Hodder AN, Anders RF, Crabb BS, et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol.* 2000;38:706-18.
149. Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Chesne-Seck ML, Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science.* 2005;308:408-11.
150. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Kanbara H. Intragenic recombination, natural selection and sequence variation in the apical membrane antigen-1 of *Plasmodium falciparum* from Thai isolates. The third MIM Pan-African malaria conference, Arusha, Tanzania. October 2-5; 2002.
151. Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Alderson T, Cohen S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol.* 1984;13:187-99.
152. Deans JA, Knight AM, Jean WC, Waters AP, Cohen S, Mitchell GH. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunol.* 1988;10:535-52.
153. Collins WE, Pye D, Crewther PE, Vandenberg KL, Galland GG, Sulzer AJ, et al. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:711-9.
154. Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, Pollock B, et al. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine.* 1998;16:240-7.
155. Amante FH, Crewther PE, Anders RF, Good MF. A cryptic T cell epitope on the apical

membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* adami can prime for an anamnestic antibody response: implications for malaria vaccine design. *J Immunol.* 1997;159:5535-44.

156. Borre MB, Dziegiel M, High B, Petersen E, Rieneck K, Riley E, et al. Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;49:119-31.

157. Dziegiel M, Borre MB, Jepsen S, Høgh B, Petersen E, Vuust J. Recombinant *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein; purification and use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44:306-13.

158. Høgh B, Petersen E, Dziegiel M, David K, Hanson A, Borre M, et al. Antibodies to a recombinant glutamate-rich *Plasmodium falciparum* protein: evidence for protection of individuals living in a holoendemic area of Liberia. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;46:307-13.

159. Dziegiel M, Rowe P, Bennett S, Allen SJ, Olerup O, Gottschau A, et al. Immunoglobulin M and G antibody responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein: correlation with clinical immunity in Gambian children. *Infect Immun.* 1993; 61:103-8.

160. Theisen M, Soe S, Oeuvray C, Thomas AW, Vuust J, Danielsen S, et al. The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *Infect Immun.* 1998;66:11-7.

161. Sim BK, Orlandi PA, Haynes JD, Klotz FW, Carter JM, Camus D, et al. 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.* 1990;111:1877-84.

162. Jakobsen PH, Heegaard PM, Koch C, Wasniowska K, Lemnge MM, et al. Identification of an erythrocyte binding peptide from the erythrocyte binding antigen, EBA-175, which blocks parasite multiplication and induces peptide-blocking antibodies. *Infect Immun.* 1998;66:4203-7.

163. Kwiatkowski D, Marsh K. Development of a malaria vaccine. *Lancet.* 1997;350:1696-701.

164. Moorthy VS, Good MF, Hill AV. Malaria vaccine developments. *Lancet.* 2004;363:150-6.

165. Williamson KC, Criscio MD, Kaslow DC. Cloning and expression of the gene for *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen, Pfs230. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;58:355-8.

166. Williamson KC, Fujioka H, Aikawa M, Kaslow DC. Stage-specific processing of Pfs230, a *Plasmodium falciparum* transmission blocking vaccine candidate. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;78:161-9.

167. Kaslow DC. Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int J Parasitol.* 1997;27:183-9.

168. Quakyi IA, Carter R, Renner J, Kumar N, Good MF, Miller LH. The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. *J Immunol.* 1987;139:4213-7.

169. Read D, Lensen AH, Begarnie S, Haley S, Raza A, Carter R. Transmission-blocking antibodies against multiple, non-variant epitopes of the *Plasmodium falciparum* gamete surface antigen Pfs230 are all complement-fixing. *Parasit Immunol.*

1994;16:511-9.

170. Targett GAT, Harte PG, Eida S, Rogers NC, Ong CSL. *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens: immunogenicity and cell-mediated responses. *Immunol Lett.* 1990;25:535-42.

171. Renner J, Graves PM, Carter R, Williams JL, Burkot TR. Target antigens of transmission-blocking immunity to gametes of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med.* 1983;158:976-81.

172. Kocken CH, Milek RL, Lensen TH, Kaslow DC, Schoenmakers JG, Konings RN. Minimal variation in the transmission-blocking vaccine candidate Pfs48/45 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1995;69:115-8.

173. Drakeley CJ, Duraisingh MT, Povoia M, Conway DJ, Targett GA, Baker DA. Geographical distribution of a variant epitope of Pfs48/45, a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;81:253-7.

174. Kaslow DC, Quakyi IA, Syin C, Raum MG, Keister DB, Coligan JE, et al. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature.* 1988;333:74-6.

175. Stowers AW, Keister DB, Muratova O, Kaslow DC. A region of *Plasmodium falciparum* antigen Pfs25 that is the target of highly potent transmission-blocking antibodies. *Infect Immun.* 2000;68:5530-8.

176. Quakyi IA, Miller LH, Good MF, Ahlers JD, Isaacs SN, Nunberg JH, et al. Synthetic peptides from *P. falciparum* sexual stage 25-kDa protein induce antibodies that react with the native protein: the role of IL-2 and conformational structure on immunogenicity of Pfs25. *Pept Res.* 1995;8:335-44.

177. Mulder B, Roeffen W, Sauerwein R,

Tchuinkam T, Boudin C, Verhave JP. Anti-Pfs25 monoclonal antibody 32F81 blocks transmission from *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers in Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90:195.

178. Barr PJ, Green KM, Gibson HL, Bathurst IC, Quakyi IA, Kaslow DC. Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *J Exp Med.* 1991;174:1203-8.

179. Gouagna LC, Mulder B, Noubissi E, Tchuinkam T, Verhave JP, Boudin C. The early sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* in laboratory-infected *Anopheles gambiae*: an estimation of parasite efficacy. *Trop Med Int Health.* 1998;3:21-8.

180. Duffy PE, Kaslow DC. A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as *falciparum* malaria transmission-blocking vaccines. *Infect Immun.* 1997;65:1109-13.

181. Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, et al. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science.* 1987;236:1661-6.

182. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Grynberg P, Cui L, Hughes AL. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2009;9:1295-300.

183. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Hughes AL. Differential selective pressures on the merozoite surface protein 2 locus of *Plasmodium falciparum* in a low endemic area. *Gene.* 2008;427:51-7.

184. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Hughes AL. Bottleneck effects on vaccine-candidate antigen diversity of malaria parasites in Thailand. *Vaccine.* 2010;28:3112-7.

185. Hughes AL. The evolution of amino acid repeat arrays in *Plasmodium* and other organisms. *J Mol Evol.* 2004;59:528-35.
186. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Karnchaisri K, Seethamchai S, Hongsrimumang T, Kanbara H. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein: Analysis of isolates mainly from low endemic areas. *Gene.* 2008;410:139-46.
187. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaithong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;84:49-56.
188. Lavazec C, Sanyal S, Templeton TJ. Expression switching in the *stevor* and *Pfmc-2TM* superfamilies in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 2007;64:1621-34.
189. Pasternak ND, Dzikowski R. PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:1463-6.
190. Udomsangpetch R, Wahlin B, Carlson J, et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. *J Exp Med.* 1989;169:1835-40.
191. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, et al. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell.* 1995;82:101-10.
192. Kyriacou HM, Stone GN, Challis RJ, Raza A, Lyke KE, Thera MA, Kon? AK, Doumbo OK, Plowe CV, Rowe JA. Differential var gene transcription in *Plasmodium falciparum* isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;150:211-8.
193. Doolan DL, Dobaio C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:13-36.
194. Casares S and Brumeanu TD. Insights into the pathogenesis of type 1Diabetes: a hint for novel immunospecific therapies. *Curr Mol Med.* 2001;1:357-78.
195. Amulic B, Salanti A, Lavstsen T, Nielsen MA, Deitsch KW. An upstream open reading frame controls translation of *var2csa*, a gene implicated in placental malaria. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000256.
196. Petter M, Bonow I, Klinkert MQ. Diverse expression patterns of subgroups of the *rif* multigene family during *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *PLoS One.* 2008;3:e3779.
197. Cortes A. Switching *Plasmodium falciparum* genes on and off for erythrocyte invasion. *Trends Parasitol.* 2008;24:517-24.
198. Stubbs J, Simpson KM, Triglia T, Pliouffe D, Tonkin CJ, Duraisingh MT, et al. Molecular mechanisms for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science.* 2005;309:1384-7.
199. Persson KE, McCallum FJ, Reiling L, Lister NA, Stubbs J, Cowman AF, et al. Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *J Clin Invest.* 2008;118:342-51.
200. Preiser PR, Jarra W, Capiod T, Snounou G. A rhotry-protein associates mechanism of clonal phenotypic variation in rodent malaria. *Nature.* 1999;398:562-3.
201. Rathore D, Nagarkatti R, Jani D, Chat-

topadhyay R, de la Vega P, Kumar S, et al. An immunologically cryptic epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein facilitates liver cell recognition and induces protective antibodies that block liver cell invasion. *J Biol Chem.* 2005; 280:20524–9.

202. Egan A, Waterfall M, Pinder M, Holder A, Riley E. Characterization of human T- and B-cell epitopes in the C terminus of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1: evidence for poor T-cell recognition of polypeptides with numerous disulfide bonds. *Infect Immun.* 1997; 65:3024–31.

203. Stephens R, Albano FR, Quin S, Pascual BJ, Harrison V, Stockinger B, et al. Malaria-specific transgenic CD4(+) T cells protect immunodeficient mice from lethal infection and demonstrate requirement for a protective threshold of antibody production for parasite clearance. *Blood.* 2005; 106:1676–84.

204. Lee EA, Flanagan KL, Minigo G, Reece WH, Bailey R, Pinder M, et al. Dimorphic *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 epitopes turn off memory T cells and interfere with T cell priming. *Eur J Immunol.* 2006;36:1168–78.

205. Casares S, Richie TL. Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:321-30.

206. Stevenson MM and Urban BC. Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria. *Parasite Immunol.* 2006;28:5–14.

207. Skorokhod OA, Alessio M, Mordmüller B, Arese P, Schwarzer E. Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *J Immunol.* 2004;173:4066–74.

208. Mukherjee P and Chauhan VS. *Plasmodium falciparum*-free merozoites and infected RBCs distinctly affect soluble CD40 ligand-mediated maturation of immature monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2008;84:244–54.

209. Joosten SA and Ottenhoff TH. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Hum Immunol.* 2008;69:760–70.

210. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korb D, King E, Fletcher H, et al. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4 + CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity.* 2005;23:287–96.

211. Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, et al. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2008;38:2697–05.

212. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol.* 2000 ;3:445-50.

213. Rappuoli R. From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nat Med.* 2004;10:1177-85.

214. Sette A and Rappuoli R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity.* 2010;33:530-41.

215. Weedall GD and Conway DJ. Detecting signatures of balancing selection to identify targets of anti-parasite immunity. *Trends Parasitol.* 2010;26:363-9.

216. Nei M and Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol.* 1986;3:418-26.

217. Hughes AL. Circumsporozoite protein genes of malaria parasites (*Plasmodium* spp.): evidence for positive selection on immunogenic regions. *Genetics*. 1991;127:345-53.
218. McDonald JH and Kreitman M. Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature*. 1991;351:652-4.
219. Hudson RR, Kreitman M, Aguade, M. A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. *Genetics*. 1987;116:153-9.
220. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123:585-95.
221. Polley SD, Tetteh KK, Lloyd JM, Akpogheneta OJ, Greenwood BM, Bojang KA, et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection. *J Infect Dis*. 2007;195:279-87.
222. Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun*. 2009;77:1165-74.
223. Fu YX and Li W-H. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 1993;133:693-709.
224. Weir BS and Hill WG. Estimating F-statistics. *Annu Rev Genet*. 2002;36:721-50.
225. Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mike ZS, Sakihama N, et al. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med*. 2000;6:689-92.
226. Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Otsuki H, Torii M. The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. *Acta Trop*. 2010 ;114:171-6.
227. Coler RN, Carter D, Friede M, Reed SG. Adjuvants for malaria vaccines. *Parasite Immunol*. 2009;31:520-8.
228. Deng GM, Nilsson IM, Verdrengh M, Collins LV, Tarkowski A. Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med*. 1999;5:702-5.
229. Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, et al. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med*. 2004;10:187-92.
230. Edelman R. The development and use of vaccine adjuvants. *Mol Biotechnol*. 2002;21:129-48.
231. Yazdani SS, Shakri AR, Mukherjee P, Baniwal SK, Chitnis CE. Evaluation of immune responses elicited in mice against a recombinant malaria vaccine based on *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Vaccine*. 2004;22:3727-37.
232. Baldrige JR & Crane RT. Monophosphoryl lipid A (MPL) formulations for the next generation of vaccines. *Methods*. 1999;19:103-7.
233. Brandenburg K & Wiese A. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Curr Top Med Chem*. 2004;4:1127-46.
234. Ribi E, Cantrell JL, Takayama K, Qureshi N, Peterson J, Ribi HO. Lipid A and immunotherapy. *Rev Infect Dis*. 1984;6:567-72.
235. Heppner DG, Gordon DM, Gross M, Welde B, Leitner W, Krzych U, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of *Plasmodium falciparum* repeatless circumsporozoite protein vac-

cine encapsulated in liposomes. *J Infect Dis.* 1996;174:361–6.

236. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, et al. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in the Gambia: a randomised trial. *Lancet.* 2001;358:1927–34.

237. Aucouturier J, Ascarateil S, Dupuis L. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine.* 2006;24(Suppl. 2):S44–5.

238. Scalzo AA, Elliott SL, Cox J, Gardner J, Moss DJ, Suhrbier A. Induction of protective cytotoxic T cells to murine cytomegalovirus by using a nonapeptide and a human-compatible adjuvant (Montanide ISA 720). *J Virol.* 1995;69:1306–9.

239. Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, Fontes E, Malkin EM, Mahanty S, et al. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One.* 2008;3:e2636.

240. Saul A, Lawrence G, Allworth A, Elliott S, Anderson K, Rzepczyk C, et al. A human phase 1 vaccine clinical trial of the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine.* 2005;23:3076–83.

241. Kensil CR, Wu JY, Soltysik S. Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. *Pharm Biotechnol.* 1995;6:525–41.

242. Pearse MJ & Drane D. ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:465–74.

243. Singh M & O'Hagan D. Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol.* 1999;17:1075–81.

244. Coler RN & Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2005;21:244–9.

245. Abdulla S, Oberholzer R, Juma O, Kubhoja S, Machera F, Membi C, et al. Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02D malaria vaccine in infants. *N Engl J Med.* 2008;359:2533–44.

246. Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:595–602.

247. Higgins D, Marshall JD, Traquina P, Van Nest G, Livingston BD. Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6:747–59.

248. Freund J, Thomson KJ, Sommer HE, Walter AW, Pisani TM. Immunization of monkeys against malaria by means of killed parasites with adjuvants. *Am J Trop Med Hyg.* 1948;28:1-22.

249. Trager W and Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 1976;193:673-5.

250. Legorreta-Herrera M, Ventura-Ayala ML, Licona-Chavez RN, Soto-Cruz I, Hernandez-Clemente FF. Early treatment during a primary malaria infection modifies the development of cross immunity. *Parasite Immunol.* 2004; 26:7-17.

251. Elliott SR, Kuns RD, Good MF. Heterologous immunity in the absence of variant-specific antibodies after exposure to subpatent infection with bloodstage malaria. *Infect Immun.* 2005; 73:2478-85.

252. Belnoue E, Voza T, Costa FT, Gruner AC, Mauduit M, Rosa DS, et al. Vaccination with live *Plasmodium yoelii* blood stage parasites under chloroquine cover induces cross-stage immunity against malaria liver stage. *J Immunol.* 2008; 181:8552-8.

253. Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet*. 2002;360:610-7.
254. Roestenberg M, McCall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJ, van Gemert GJ, et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *N Engl J Med*. 2009; 361:468-77.
255. Hoffman SL, Billingsley PF, James E, Richman A, Loyevsky M, Li T, et al. Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum Vaccines*. 2010;6:97-106.
256. Bruder JT, Angov E, Limbach KJ, Richie TL. Molecular vaccines for malaria. *Hum Vaccines*. 2010;6:54-77.
257. Cohen J, Nussenzweig V, Nussenzweig R, Vekemans J, Leach A. From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. *Hum Vaccines*. 2010;6:90-6.
258. Brown AE, Singharaj P, Webster HK, Pipithkul J, Gordon DM, Boslego JW, et al. Safety, immunogenicity and limited efficacy study of a recombinant *Plasmodium falciparum* circumsporozoite vaccine in Thai soldiers. *Vaccine*. 1994;12:102.
259. Sherwood JA, Copeland RS, Taylor KA, Abok K, Oloo AJ, Were JB, et al. *Plasmodium falciparum* circumsporozoite vaccine immunogenicity and efficacy trial with natural challenge quantitation in an area of endemic human malaria of Kenya. *Vaccine*. 1996;14:817-27.
260. Rutgers T, Cabezon T, Harford N, Vanderbrugge D, Descurieux M, Van Opstal O, et al. Expression of different forms of HBV envelope proteins in yeast. *J Med Virology*. 1987;21:53.
261. Vreden SGS, Verhave JP, Oettinger T, Sauerwein RW, Meuwissen JHET. Phase I clinical trial of a recombinant malaria vaccine consisting of the circumsporozoite repeat region of *Plasmodium falciparum* coupled to hepatitis B surface antigen. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45:533-8.
262. Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, Cohen JC, Schneider I, LaChance R, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein/HBsAg subunit vaccine. *J Inf Dis*. 1995;171:1576-85.
263. Kester KE, McKinney DA, Ockenhouse CF, Heppner DG, Welde BT, Stoute JA, et al. Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 2001;183:640-7.
264. Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, Ockenhouse CF, Heppner DG, Hall T, et al. A phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy bridging randomized study of a two-dose regimen of liquid and lyophilized formulations of the candidate malaria vaccine RTS,S/AS02A in malaria-native adults. *Vaccine*. 2007;25:3559-66.
265. Kester KE, Cummings JF, Ockenhouse CF, Nielsen R, Hall BT, Gordon DM, et al. Phase 2a trial of 0, 1 and 3 month and 0, 7 and 28 day immunization schedules of malaria vaccine RTS,S/AS02 in malaria naive adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine*. 2008;26:2191-202.
266. Allouche A, Milligan P, Conway DJ. Protective efficacy of the RTS,S/AS02A *Plasmodium falciparum* malaria vaccine is not strain specific. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:97-101.
267. Bojang K, Milligan P, Pinder M, Doherty

T, Leach A, Ofori-Anyinam O, et al. Five year safety and immunogenicity of GlaxoSmithKline's candidate malaria vaccine RTS,S/AS02 following administration to semi-immune adult men living in a malaria-endemic region of The Gambia. *Hum Vaccines*. 2009;5:242-7.

268. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364:1411-20.

269. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Aide P, et al. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: singleblind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;366:2012-8.

270. Aponte JJ, Aide P, Renom M, Mandomando I, Bassat Q, Sacarlal J, et al. Safety of the RTS,S/AS02D vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in infants. A phase I/IIb trial in a highly endemic area in Mozambique. *Lancet*. 2007;370:1543-51.

271. Mettens P, Dubois P, Demoitie MA, Bayat B, Donner M-N, Bourguignon P, et al. Improved T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in mice and monkeys induced by a novel formulation of RTS,S vaccine Antigen. *Vaccine*. 2008;26:1072-82.

272. Kester KK, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, Ockenhouse CF, Krzych U, Moris P, et al. Randomized, double-blind, phase 2a trial of *Falciparum* malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults; safety, efficacy and immunologic associates of protection. *J Infect Dis*.

2009;200:337-46.

273. Withers MR, McKinney D, Ogutu BR, Waitumbi JN, Milman JB, Apollo OJ, et al. Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. *PLoS Clin Trials*. 2006;1:32.

274. Ogutu BR, Apollo OJ, McKinney D, Okoth W, Siangla J, Dubovsky F, et al. Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in western Kenya. *PLoS One*. 2009;4:4708.

275. Malkin E, Long CA, Stowers AW, Zou L, Singh S, MacDonald NJ, et al. Phase 1 study of two merozoite surface protein 1 (MSP1(42)) vaccines for *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Clin Trials*. 2007;2:12.

276. Polhemus ME, Magill AJ, Cummings JF, Kester KE, Ockenhouse CF, Lanar DE, et al. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1)FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naive adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine*. 2007;25:4203-12.

277. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Kone AK, Guindo AB, et al. Safety and immunogenicity of an AMA-1 malaria vaccine in Malian adults: results of a phase 1 randomized controlled trial. *PLoS One*. 2008;3:1465.

278. Lyke KE, Daou M, Diarra I, Kone A, Kouriba B, Thera MA, et al. Cell-mediated immunity elicited by the blood stage malaria vaccine apical membrane antigen 1 in Malian adults: results of a Phase I randomized trial. *Vaccine*. 2009;27:2171-6.

279. Spring MD, Cummings JF, Ockenhouse CF, Dutta S, Reidler R, Angov E, et al. Phase 1/2a

study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. PLoS One. 2009;4:5254.

280. Genton B, Al-Yaman F, Anders R, Saul A, Brown G, Pye D, et al. Safety and immunogenicity of a threecomponent blood-stage malaria vaccine in adults living in an endemic area of Papua New Guinea. Vaccine. 2000;18:2504-11.

281. Lawrence G, Cheng QQ, Reed C, Taylor D, Stowers A, Cloonan N, et al. Effect of vaccination with 3 recombinant asexual-stage malaria antigens on initial growth rates of *Plasmodium falciparum* in nonimmune volunteers. Vaccine. 2000;18:1925-31.

282. Genton B, Al-Yaman F, Betuela I, Anders RF, Saul A, Baea K, et al. Safety and immunogenicity of a three component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. Vaccine. 2003;22:30-41.

283. Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders RF, Saul A, et al. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1—2b trial in Papua New Guinea. J Infect Dis. 2002;185:820-7.

284. Malkin E, Hu J, Li Z, Chen Z, Bi X, Reed Z, et al. A phase 1 trial of PfCP2.9: an AMA1/MSP1 chimeric recombinant protein vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. Vaccine. 2008;26:6864-73.

285. Hu J, Chen Z, Gu J, Wan M, Shen Q, Kieny MP, et al. Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, *Plasmodium falciparum* AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults. PLoS One. 2008;3:1952.

286. Esen M, Kremsner PG, Schleucher R,

Gassler M, Imoukhuede EB, Imbault N, et al. Safety and immunogenicity of GMZ2: a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. Vaccine 2009;27:6862-8.

287. Ferreira A, Schofield L, Enea V, Schellekens H, van der Meide P, Collins WE, et al. Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon. Science. 1986;232:881-4.

288. Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, Weir JP, Goodbary M, Slayter M, et al. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells. J Exp Med. 1994;180:353-8.

289. Nardin EH, Oliveira GA, Calvo-Calle JM, Nussenzweig RS. The use of multiple antigen peptides in the analysis and induction of protective immune responses against infectious diseases. Adv Immunol. 1995;60:105-49.

290. Munesinghe DY, Clavijo P, Calle MC, Nussenzweig RS, Nardin E. Immunogenicity of multiple antigen peptides (MAP) containing T and B cell epitopes of the repeat region of the *P. falciparum* circumsporozoite protein. Eur J Immunol. 1991;21:3015-20.

291. Nardin EH, Oliveira GA, Calvo-Calle JM, Castro ZR, Nussenzweig RS, Schmeckpeper B, et al. Synthetic peptide malaria vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. J Infect Dis. 2000;182:1486-96.

292. Moreno A, Clavijo P, Edelman R, Davis J, Sztein M, Sinigaglia F, et al. CD4+ T cell clones obtained from *Plasmodium falciparum* sporozoite-immunized volunteers recognize polymorphic

- sequences of the circumsporozoite protein. *J Immunol.* 1993;151:489-99.
293. Frevert U, Moreno A, Calvo-Calle JM, Klotz C, Nardin E. Imaging effector functions of human cytotoxic CD4+ T cells specific for *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Int J Parasitol.* 2009;39:119-32.
294. Theisen M, Doodoo D, Toure-Balde A, Soe S, Corradin G, Koram KK, et al. Selection of glutamate-rich protein long synthetic peptides for vaccine development: antigenicity and relationship with clinical protection and immunogenicity. *Infect Immun.* 2001;69:5223-9.
295. Hermsen CC, Verhage DF, Telgt DS, Teelen K, Bousema JT, Roestenberg M, et al. Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit in vitro growth of *Plasmodium falciparum* in a phase 1 malaria vaccine trial. *Vaccine.* 2007; 25:2930-40.
296. Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, et al. Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood.* 1994;84:1594-602.
297. Audran R, Cachat M, Lurati F, Soe S, Leroy O, Corradin G, et al. Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. *Infect Immun.* 2005;73:8017-26.
298. Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, et al. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med.* 2005;2:344.
299. Sirima SB, Nebie I, Ouedraogo A, Tiono AB, Konate AT, Gansane A, et al. Safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 long synthetic peptide (MSP3-LSP) malaria vaccine in healthy, semi-immune adult males in Burkina Faso, West Africa. *Vaccine.* 2007;25:2723-32.
300. Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P, et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 1988;332:158-61.
301. Bermudez A, Reyes C, Guzman F, Vanegas M, Rosas J, Amador R, et al. Synthetic vaccine update: applying lessons learned from recent SPf66 malarial vaccine physicochemical, structural and immunological characterization. *Vaccine.* 2007;25:4487-501.
302. Graves P, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (SPf66). *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;5966.
303. Moser C, Amacker M, Kammer AR, Rasi S, Westerfeld N, Zurbriggen R. Influenza virosomes as a combined vaccine carrier and adjuvant system for prophylactic and therapeutic immunizations. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6:711-21.
304. Arkema A, Huckriede A, Schoen P, Wilschut J, Daemen T. Induction of cytotoxic T lymphocyte activity by fusion-active peptide-containing virosomes. *Vaccine.* 2000;18:1327-33.
305. Kammer AR, Amacker M, Rasi S, Westerfeld N, Gremion C, Neuhaus D, et al. A new and versatile virosomal antigen delivery system to induce cellular and humoral immune responses. *Vaccine.* 2007;25:7065-74.
306. Okitsu SL, Kienzl U, Moehle K, Silvie

O, Peduzzi E, Mueller MS, et al. Structure-activity-based design of a synthetic malaria peptide eliciting sporozoite inhibitory antibodies in a virosomal formulation. *Chem Biol.* 2007;14:577-87.

307. Genton B, Pluschke G, Degen L, Kammer AR, Westerfeld N, Okitsu SL, et al. A randomized placebo-controlled phase Ia malaria vaccine trial of two virosome-formulated synthetic peptides in healthy adult volunteers. *PLoS One.* 2007;2:e1018.
