หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดกับคนและสัตว์มีกระดูกสันหลังแทบทุกชนิด มีสาเหตุจากสัตว์เซลล์เดียวที่อยู่ใน Phylum Protozoa Class Sporozoa และ Genus Plasmodium มีพาหะเป็นยุงก้นปล่องเพศเมีย เชื้อมาลาเรียมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น เชื้อมาลาเรียของสัตว์ฟันแทะ (Rodent) ได้แก่ Plasmodium berghei (P. berghei) P. yoelii และ P. vinckei เชื้อมาลาเรียของลิง (Simian) ได้แก่ P. knowlesi P. cyanomolgi และ P. brasilianum เชื้อมาลาเรียของสัตว์ปีก (Aves) ได้แก่ P. liphurae และ P. gallinaceum สำหรับเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนมีอยู่ 4 ชนิด คือ P. falciparum P. vivax P. malariae และ P. ovale ใน 4 ชนิดนี้ P. falciparum จะก่อให้เกิดอาการรุนแรงมากที่สุด อาการทั่วไปของโรคมาลาเรียจะเนื่องมาจากผลของการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อในระยะสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ (asexual erythrocytic stage) ซึ่งเจริญในโฮสต์ (host) ที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง อาการที่พบได้แก่ เป็นไข้หนาวสั่น จับไข้เป็นระยะ ๆ เช่น อาจจับไข้ทุกวัน หรือ วันเว้นวัน หรือ วันเว้นสองวัน [illegible]

เป็นโรคที่เป็นปัญหาสาคัญยงทางดานสาธารณสุข ทำอันตรายต่อสุขภาพและชีวิตของประชาชนทำให้เกิดผลกระทบต่อความมั่นคงทางเศรษฐกิจ และการพัฒนาประเทศ จากการสำรวจในปี 1986 พบว่าประชาชนในเกือบ 100 ประเทศ หรือประมาณ 56 เปอร์เซนต์ของประชากรโลกอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย (Wernsdorfer, 1986) จากรายงานของที่ประชุมสมัชชาใหญ่ ครั้งที่ 31 ประจำปี 1978 ขององค์การอนามัยโลก สรุปว่า ทุก ๆ ปี ประชากรโลกจำนวนถึง 150 ล้านคนได้ป่วยเป็นโรคมาลาเรีย และมีอัตราการตายของเด็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบ ประมาณ 1 ล้านคนต่อปี ซึ่งเป็นการสูญเสียทรัพยากรมนุษย์ของโลกไปปีละมากมาย ดังนั้นทางองค์การอนามัยโลกจึงจัดโรคมาลาเรียไว้เป็นอันดับหนึ่งในจำนวนโรคร้ายแรงเขตเมืองร้อน 6 โรค และยังได้สนับสนุนช่วยเหลือโครงการวิจัยทางด้านมาลาเรียอีกมากมาย

สำหรับในประเทศไทยพบเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด คือ P. falciparum, P. vivax, P. malariae และ P. ovale ซึ่ง P. malariae จะพบน้อยมาก ส่วน P. ovalae นั้นเพิ่งมีรายงานว่าพบเมื่อปี 1984 ชนิดที่ก่อให้เกิดอาการรุนแรง และทำให้ผู้ป่วยมีอาการมาลาเรียขึ้นสมอง ถึงแก่ความตายได้ คือ P. falciparum โรคมาลาเรียนี้มีแพร่กระจายอยู่ทั่วประเทศไทย และพื้นที่ที่มีมาลาเรียชุกชุมมีประมาณ 1 ใน 10 ของพื้นที่ในประเทศ ซึ่งได้แก่ พื้นที่ในจังหวัด

แม่ฮ่องสอน ตาก น่าน แพร่ นครราชสีมา สระบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ตราด ระยอง จันทบุรี กาญจนบุรี ระนอง สงขลา ตรัง พังงา กระบี่ และสตูล กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ดำเนินการรณรงค์ปราบปรามโรคนี้ มีเป้าหมายในการควบคุมพาหะนำโรค เพื่อลดอัตราการแพร่กระจาย และหยุดยั้งการติดต่อของโรค แต่ปัญหาในการควบคุมพาหะนำโรคที่เกิดขึ้นในเวลาต่อมา และทำให้การควบคุมไม่ได้ผลเท่าที่ควรนั้นเนื่องมาจากยุงซึ่งเป็นพาหะสามารถปรับตัวให้มีความทนทานต่อยาฆ่าแมลงโดยเฉพาะดีดีทีได้สูงขึ้นจนถึงขั้นดื้อยา ปัญหานี้ได้เกิดขึ้นกับทุกประเทศที่มีการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย มิใช่เกิดเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น จากการประชุมของกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ที่ได้รับการสนับสนุนจากองค์การอนามัยโลกให้ทำการวิจัยเกี่ยวกับโรคมาลาเรีย ในปี 1984 ที่กรุงวอชิงตัน ดีซี ได้เน้นให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาถึงชีวลักษณะ (biological characterization) ของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งจะเป็นปัจจัยพื้นฐานและเป็นข้อมูลที่สำคัญของการศึกษาในระดับสูง เพื่อจะหาวิธีกำจัดโรคนี้ต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ P. falciparum ที่ก่อให้เกิดอาการรุนแรงที่สุด แต่การศึกษาคุณลักษณะทางชีววิทยาของเชื้อนี้ยังมีน้อย และได้เริ่มศึกษากันอย่างจริงจังตั้งแต่ปี 1976 เป็นต้นไป ทั้งนี้เพราะได้มีการค้นพบวิธีการเลี้ยง P. falciparum อย่างต่อเนื่องในจานเพาะเลี้ยงได้สำเร็จ (Trager และ Jensen, 1976) ทำให้ได้เชื้อในปริมาณที่มากพอจะทำการศึกษาในหลายแง่มุม

ในระยะแรกที่เริ่มทำการศึกษาถึงชีวลักษณะของเชื้อ P. falciparum นั้นอาศัยรูปแบบของ isoenzyme ที่แตกต่างกัน (Carter, 1978; Thaithong et al., 1981) การทดสอบความแตกต่างในการตอบสนองต่อยา (Thaithong et al., 1981) ต่อมาได้มีการศึกษาในระดับโมเลกุลที่ละเอียดยิ่งขึ้น ได้แก่การศึกษาถึงรูปแบบของโปรตีน (Tait, 1981) และการศึกษาคุณสมบัติด้านภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological characterization) โดยการใช้ monoclonal antibody (MCAb) (McBride et al., 1984) แต่ทั้งสองวิธีนี้มีข้อจำกัดอยู่ที่ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการปฏิบัติ และการแปรผลการทดลอง ซึ่งวิธีการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ P. falciparum ที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นการจำแนกเชื้อในระดับฟีโนไทพ์ (phenotype) ซึ่งอาจถูกเปลี่ยนแปลงได้โดยสภาวะแวดล้อม ระยะของเชื้อที่ใช้ทำการศึกษา ยา หรือสารเคมีอื่น ๆ ที่เชื้อได้รับจึงอาจทำให้ผลการศึกษาแปรเปลี่ยนได้

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเพื่อจะหาเทคนิคที่จะนำมาจำแนกความแตกต่างของ P. falciparum ให้ลึกลงไปถึงในระดับยีน เพราะเอ็นไซม์ หรือสารประกอบโปรตีนในสิ่งมีชีวิตจะถูกสร้างและควบคุมโดยหน่วยย่อยทางพันธุกรรม คือ ยีน เมื่อเอ็นไซม์ สารประกอบโปรตีน และ ยีน มีความสัมพันธ์กันโดยตรงจึงควรจะได้ทำการศึกษาถึงความแตกต่าง หรือคล้ายคลึงกันของรูปแบบเอ็นไซม์ รูปแบบโปรตีน และรูปแบบของยีน ซึ่งก็คือการนำเอาผลการศึกษาชีวลักษณะ

ของเชื้อในระดับฟีโนไทพ์มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับการศึกษาในระดับจีโนไทพ์ (genotype) เพื่อให้ได้ผลการศึกษาละเอียดและแน่นอนยิ่งขึ้น

แม้ว่าเชื้อ P. falciparum จะมีความสำคัญ แต่การศึกษาในระดับยีนยังมีน้อยมาก เนื่องจากต้องใช้เชื้อปริมาณมากในการศึกษา จนกระทั่งในปี 1971 มีการศึกษาพบว่าดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum มีปริมาณ 0.2 Pg ต่อหนึ่งนิวเคลียส (Gutteridge, 1971) เชื้อจะเริ่มสังเคราะห์ดีเอนเอขึ้นในระยะโทรโฟซอยท์ (trophozoite) คือช่วง 29 ถึง 31 ชั่วโมงหลังจากเข้าสู่เม็ดเลือดแดง การสังเคราะห์จะต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ จนถึงระยะไซซอนท์ (schizont) จึงหยุดการสังเคราะห์ (Inselberg และ Benyal, 1984) และจากการศึกษาโครโมโซมของ P. falciparum พบว่ามีกรดนิวคลีอิคเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 3.8×10^{8} นิวคลีโอไทด์ และในดีเอนเอมีการซ้ำ (repetitive DNA) อยู่ประมาณ 10 เปอร์เซนต์ และโดยเฉลี่ยมีลำดับเบส (base sequence) ซ้ำกันอยู่ 95 ชุด (copies) (Hough-Evans และ Howars, 1982) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเบสกัวนีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในดีเอนเอมีอยู่ประมาณ 19 เปอร์เซนต์ และปริมาณเบสอะดีนีน (adenine) และ ไทมิดีน (thymidine) พบอยู่ประมาณ 81 เปอร์เซนต์ (Pollack et al., 1982; Goman et al., 1982) และจากการศึกษาของ Guntaka และคณะ ซึ่งได้ทดลองสกัดดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum ในระยะเมอโรซอยท์ (merozoite) พบว่าส่วนที่ซ้ำกันมีอยู่ทั่วไปตลอดทั้งจีโนม (genome) (Guntaka et al., 1985)

จากความรู้พื้นฐานเหล่านี้ปัจจุบันได้มีการพัฒนาประยุกต์เป็นเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม สามารถสร้างรีคอมบิเนนท์ ดีเอนเอ (recombinant DNA) มาสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นแอนติเจน (antigen) เพื่อสร้างวัคซีนที่เฉพาะต่อเชื้อ Plasmodium และมีประสิทธิภาพกระตุ้นให้ร่างกายของโฮสต์ (host) สร้างแอนติบอดี (antibody) ได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคนี้มาช่วยสร้างดีเอนเอตรวจสอบ (DNA probe) ซึ่งเป็นท่อนดีเอนเอของเชื้อ Plasmodium ชนิดต่าง ๆ ใช้ในการตรวจหา และจำแนกชนิดของเชื้อ Plasmodium ได้อีกด้วย ดังตัวอย่างเช่น Ferreita และคณะ สามารถใช้ดีเอนเอตรวจสอบตรวจหาเชื้อ P. berghei ในตับหนูได้ (Ferreita et al., 1986) Fenzen และคณะสามารถใช้ดีเอนเอตรวจสอบตรวจหาเชื้อ P. falciparum จากเลือดผู้ป่วยได้แม้ว่าในเลือดจะมีดีเอนเอของเชื้อเพียง 25 Pg. (Fenzen et al., 1984) ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคนี้ให้ดีขึ้นโดยการสร้างดีเอนเอตรวจสอบที่มีความไวมากขึ้นและมีความจำเพาะต่อชนิด (species specific) โดย Barker และคณะ ได้สร้างดีเอนเอตรวจสอบที่มีความไวมากสามารถตรวจหาดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum ได้พบในปริมาณเพียง 10 Pg. และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ดี (Barker et al., 1986)

ดีเอนเอตรวจสอบนอกจากจะใช้ตรวจหาเชื้อแล้วยังสามารถนำมาใช้ในการแยกชนิดของเชื้อได้ดีอีกด้วย (Bhasin et al., 1985) การจำแนกชนิดของเชื้อ P. falciparum สามารถจำแนกได้หลายวิธี อาจใช้คุณสมบัติทางชีววิทยา คุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา ที่นิยมใช้กันอยู่ซึ่งเป็นการจำแนกเชื้อในระดับฟีโนไทพ์ ส่วนการจำแนก P. falciparum โดยอาศัยดีเอนเอ-ตรวจสอบจะเป็นการบอกความแตกต่างของเชื้อในระดับจีโนไทพ์ (genotypic variation) ซึ่งการจำแนกเชื้อโดยอาศัยวิธีดังกล่าวนี้genotypic variation น่าจะเป็นชีวลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเชื้อได้ดีอีกวิธีหนึ่ง

สำหรับรายงานเกี่ยวกับดีเอนเอตรวจสอบของเชื้อ P. falciparum ในประเทศไทยได้มีรายงานในปี 1983 โดย Tirawanchai ได้สร้างดีเอนเอตรวจสอบ คือ $pBRK_{1-14}$ จากเชื้อ P. falciparum (Tirawanchai, 1983) และในปี 1984 Intapruk ได้นำ $pBRK_{1-14}$ นี้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และใช้ $pBRK_{1-14}$ ไปตรวจหาเชื้อในระยะโอโอซีสท์ (oocyst) และสปอโรซอยท์ (sporozoite) ในยุงได้โดยไม่เกิดไฮบริไดเซชันกับดีเอนเอของ P. vivax ของยุงก้นปล่อง และเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (Intapruk, 1984) ต่อมาในปี 1985 Fucharoen ได้นำ $pBRK_{1-14}$ มาใช้ในการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) ของเชื้อ P. falciparum แต่แยกเพียง 2 สายพันธุ์บริสุทธิ์เท่านั้น และพบว่ามีความแตกต่าง (Fuchaaroen, 1985) อย่างไรก็ตามควรจะได้มีการทดลองใช้ $pBRK_{1-14}$ ในการแยก P. falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์ซึ่งมีคุณสมบัติทางฟีโนไทพ์ใกล้เคียงกัน โดยเพิ่มจำนวนสายพันธุ์บริสุทธิ์ให้มากขึ้น

การทดลองนี้จึงนำ $pBRK_{1-14}$ มาใช้ในการจำแนกเชื้อ P. falciparum ในสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อ P. falciparum ไอโซเลตต่าง ๆ ได้แก่ CH_{1so} CH_{1soR} TM_{4} TM_{90} และ TM_{142R} ไอโซเลต CH_{1so} เป็นไอโซเลตที่น่าสนใจเนื่องจากมีการดื้อต่อยาเมฟโฟลควิน (mefloquine) และได้นำเอามาแยกเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้งก่อนการรักษาด้วยยาเมฟโฟลควิน (pre-treatment clones) และหลังการรักษาด้วยยาเมฟโฟลควิน (recru-descent clones) ซึ่งแยกได้ 10 และ 7 สายพันธุ์บริสุทธิ์ตามลำดับ Pinswadi และคณะได้ทำการศึกษาถึงรูปแบบของโปรตีนของสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง CH_{1so} และ CH_{1soR} โดยวิธี 2 di-mensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DPAGE) ซึ่งสามารถแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ของ CH_{1so} และ CH_{1soR} ออกได้เป็น 6 กลุ่ม (Pinswadi et al., 1987) การทดลองนี้จึงได้นำเอา P. falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง CH_{1so} และ CH_{1soR} มาศึกษารูปแบบของดีเอนเอ เพื่อทำการเปรียบเทียบกับผลความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนว่าจะมีความสอดคล้องกันหรือไม่เพียงไร และเปรียบเทียบรูปแบบดีเอนเอกับสายพันธุ์บริสุทธิ์อื่น ๆ ที่กล่าวไว้ข้างต้นว่าจะสามารถบอกความแตกต่างได้หรือไม่ และถ้าสามารถบอกความแตกต่างได้อย่าง

ชัดเจนแล้ว วิธีการใช้ดีเอนเอตรวจสอบก็จะเป็นวิธีหนึ่งที่จะใช้จำแนกคุณลักษณะของเชื้อมาลาเรีย ได้เป็นอย่างดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย