



UPPSALA
UNIVERSITET

Malaria- Ett svårbesegrat hot

Martin Östberg

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2010
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Malaria är en av de vanligaste parasitsjukdomarna i världen och är endemisk i 108 länder. Detta innebär att nära hälften av jordens befolkning riskerar att komma i kontakt med sjukdomen och ca 247 miljoner insjuknade under år 2008 vilket resulterade i ungefär 1 miljon dödsfall.

Malaria orsakas av apikomplexa eukaryoter av släktet *Plasmodium*. Parasiten sprids genom honmyggor av släktet *Anopheles*, ett släkte som finns utbrett i nästan alla tempererade, tropiska och subtropiska regioner i världen. *Plasmodium* har en komplicerad livscykel som delas in i tre faser som beror på var parasiten befinner sig: pre-erytrocytisk, erytrocytisk och reproduktiv. Symptomen vid en malariainfektion varierar och beror på vilken art av *Plasmodium* individen smittas med samt vilken motståndskraft individen har. Vanliga symptom som gäller för alla arter av *Plasmodium* är dock feber, illamående, frossa, utmattning, muskelvärk, magvärk och kräkningar. Utifrån hur symptomen yttrar sig delar man in malaria i två grupper: okomplicerad respektive komplicerad malaria.

Plasmodium kan undvika immunförsvaret genom att strukturen hos dess ytproteiner kan variera. *P. falciparum* är den art av *Plasmodium* som har störst förmåga att undvika immunförsvaret. I tillägg till ovannämnda mekanism kan den även modifiera de erythrocyter de infekterar så att dem fäster på insidan av olika vaskulära kärl och därmed undkommer eliminering i sekundära lymfoida organ. Ytterligare mekanismer som försvårar för immunförsvaret är att molekyllär mimikry förekommer hos *P. falciparum* och att *P. falciparum* även kan infektera erythrocyter på olika sätt.

Det finns idag inget vaccin mot malaria men flera kliniska prövningar av vaccin utförs och flera olika malariamediciner finns att tillgå även om resistens är ett växande problem.

Inledning

Malaria är idag en av de parasitsjukdomar som smittar flest i världen med ca 247 miljoner fall år 2008 och utav dessa avled ca en miljon (WHO 2010a). Uppemot hälften av jordens befolkning riskerar att komma i kontakt med sjukdomen då den är endemisk i ett mycket stort område (WHO 2010a). Malaria förekommer främst i tropikerna vilket är en starkt bidragande orsak till att så många smittas eller riskerar att smittas då befolkningstätheten i dessa områden ofta är hög och fattigdom vanligt förekommande (WHO 2010a). Malaria har haft ett mycket större utbredningsområde än den har idag och fanns i stora delar av Nordamerika och Europa ända in på 1900 talet.

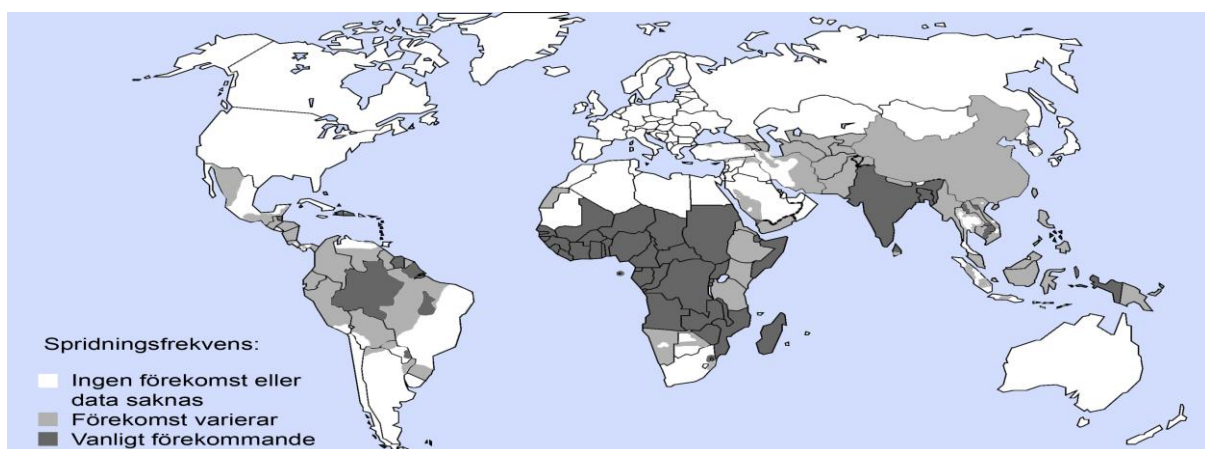
Det jag vill fokusera på i mitt arbete är hur malaria sprids och hur malariaparasitens livscykel ser ut samt orsakerna till parasitens låga immunogenicitet (förmågan att framkalla en reaktion hos immunförsvaret), vilka behandlingar som finns, pågående vaccinstudier samt försöka ta reda på varför det är så svårt att hitta ett vaccin mot malaria.

Orsaken till sjukdomen malaria

Malaria orsakas av apikomplexa, eukaryoter som tillhör släktet *Plasmodium*. Det finns idag fem arter beskrivna som normalt kan infektera människan: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* och *Plasmodium vivax* där *P. falciparum* är den som är mest virulent och orsakar flest dödsfall (Richards och Beeson 2009). Parasiterna sprids via honmyggor av släktet *Anopheles*. Det finns idag ca 430 arter av *Anopheles* beskrivna varav 30-40 räknas som spridningsvektorer för malariaparasiterna (CDC 2010a).

Malarias utbredning

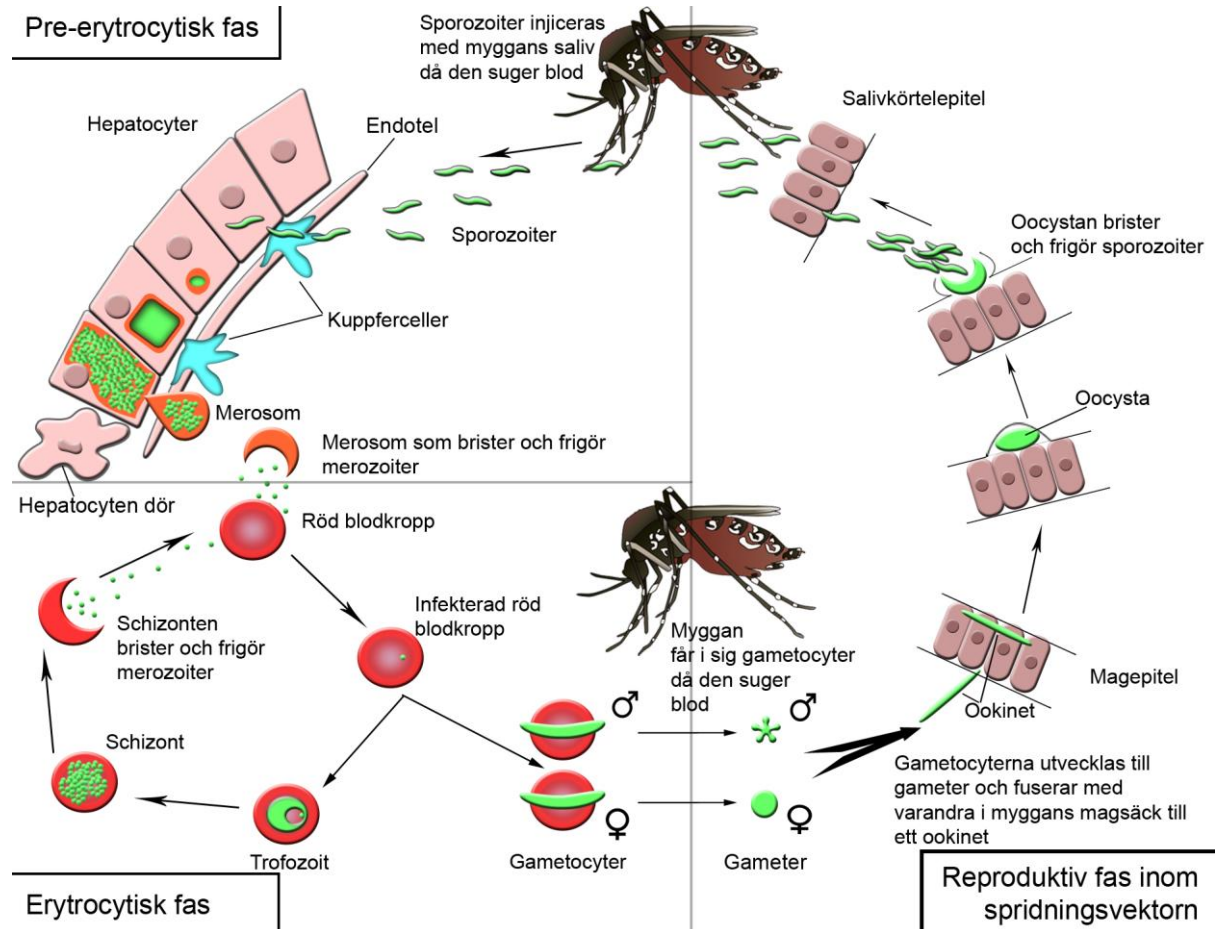
Utbredningen av malaria idag är stor och ca hälften av jordens befolkning riskerar att komma i kontakt med parasiten på grund av att den är utbredd över ett mycket stort område (se figur 1). Malaria är endemisk i 108 länder (2008) och den farligaste arten *P. falciparum* är endemisk i 81 av dem varav 42 länder i Afrika (WHO 2010a).



Figur 1. Karta över malarias utbredning. Data från CDC (2010b) och vektorkarta från Brimelow (2006) med tillstånd.

Livscykel

Malariaparasiternas livscykel är väldigt komplex (se figur 2) och består främst av asexuella faser men också en sexuell fas. De olika faserna parasiten går in i beror på en rad olika faktorer som har att göra med var parasiten befinner sig. De brukar delas in i tre steg.



Figur 2. En schematisk bild av plasmodiums livscykel. Alla figurer i grönt representerar plasmodium i olika faser. Livscykeln börjar då en infekterad mygga sticker en individ. Sporozoiter injiceras via myggans saliv och transporteras sedan via blodomloppet till levern. Sporozoiterna penetrerar sedan blodkärlens endotel i levern varpå de använder kuppfceller som portal för att ta sig in i hepatocyterna. Inom hepatocyterna replikerar sig parasiten asexuellt tills dess hepatocyten brister. Ur hepatocyten bildas en merosom innehållandes merozoiter. Merosomen transporteras sedan runt i blodomloppet för att slutligen brista och frigöra merozoiterna som i sin tur infekterar närliggande erythrocyter. Merozoiterna kan sedan ge upphov till gametocyter eller flera merozoiter. De gametocyter som bildas transporteras sedan runt i blodomloppet till dess att de tas upp av en stickande mygga. Gametocyterna ger upphov till gameter i myggans magsäck och de gameter som där fuserar med varandra bildar ookinet. Dessa ookinet tränger in i epitelet i myggans magsäck. I magsäckens epitel bildar ookineterna oocyster som i sin tur ger upphov till nya sporozoiter. Dessa sporozoiter färdas sedan via myggans öppna cirkulationssystem till myggans salivkörtlar där de penetrerar salivkörtelepitelet och tar sig in i salivkörteln. När myggan sedan sticker en individ börjar cykeln om igen. Vektorgrafik för myggorna från Saxby(2010) med tillstånd.

Pre-erytrocytisk fas

Första steget i livscykeln är när en infekterad anophelesmygga suger blod av en individ, något den endast gör då den är dräktig. Individens infekteras då den infekterade myggan injicerar sin saliv, innehållandes s.k. sporozoiter, för att stoppa blodets koagulering (se figur 2). Efter att sporozoiterna har kommit in i blodomloppet tar det sedan ca en timme för dem att

transporteras till levern varpå de infekterar leverceller, hepatocyter, genom att ytproteinerna circumsporozoitprotein (CSP) och thrombospondinrelaterat anonymt protein (TRAP) binder till heparansulfat på hepatocyten yta och därmed medierar deras förflyttning över membranet (Robson *et al.* 1995; Trampuz *et al.* 2003; Niloofar *et al.* 2004). Ytterligare ett protein hos hepatocyterna har identifierats som ett viktigt mål för sporozoiterna vid invasion nämligen ytproteinet differentieringskluster 81 (CD81). I en studie kring CD81s roll vid hepatocytinvasion av *P. falciparum* och *Plasmodium yoelii* visade det sig att sporozoiter av *P. falciparum* var beroende av just CD81 för att kunna infektera hepatocyter (Silvie *et al.* 2003). Hur sporozoiterna interagerar med CD81 är dock fortfarande oklart. Hur sporozoiterna tar sig förbi blod-leverbarriären (genom endotelet) har också varit okänt och omdiskuterat men flera studier indikerar att makrofager i området (kupfferceller) kan fungera likt en portal för sporozoiterna (Ishino *et al.* 2004; Frevert *et al.* 2005; Baer *et al.* 2007b).

Väl inne i hepatocyterna delar sig sporozoiterna tusenfalt genom asexuell celledelning till så kallade merozoiter tills hepatocyten brister. Dessa merozoiter bildar sedan kluster som kallas merosomer (Baer *et al.* 2007a). *P. vivax* och *P. ovale* kan, till skillnad från de andra, även bilda hypnozoiter som kan ligga i dvala i hepatocyterna under månader eller år (Trampuz *et al.* 2003).

Erythrocytisk fas

Merosomerna transporteras sedan runt i blodomloppet tills de brister, varpå merozoiterna invaderar erythrocyter (röda blodkroppar) i sin närhet (se figur 2). Denna invasion är en flerstegsprocess där merozoiten först binder till erythrocytens yta för att sedan anpassa sin orientering så att dess apikala sida blir vänd mot erythrocyten. Merozoiten frambringar sedan en kontaktpunkt med täta fogar mot erythrocytens membran, varpå den frigör enzymer som löser upp erythrocytmembranet vid kontaktpunkten så att merozoiten kan ta sig in (Aikawa *et al.* 1978). Hur merozoiterna känner igen och binder till erythrocyterna har visat sig vara en mycket komplex process och många delar i den är fortfarande inte förklarade. Flera olika faktorer tycks spela in. Många familjer av ytproteiner och enskilda ytproteiner som uttrycks på merozoiternas membran har blivit identifierade som nödvändiga eller potentiellt viktiga vid denna process. Bland annat merozoitytproteiner (MSP), apikalt membranantigen 1 (AMA-1) samt proteinsuperfamiljerna, det vill säga stora familjer av proteiner med likvärdig struktur, duffybindningslika proteiner (DBL), retikulocytbindningslika proteiner (RBL) och erythrocytbindande protein (EBA). De olika arterna av *Plasmodium* innehåller inte alla dessa typer av proteiner. Vissa strukturer, främst glykoproteiner, hos erythrocyterna har observerats binda till några av dessa proteiner men många frågetecken återstår (Miller *et al.* 1975; Camus och Hadley 1985; Adams *et al.* 1990; Galinski *et al.* 1992; Holder och Blackman 1994; Mitchell *et al.* 2004).

Väl inne i erythrocyterna antar merozoiterna en mer ringformad struktur och kallas då för trofozoiter. I detta stadium tar de upp näring i form av hemoglobin för att sedan, när hemoglobinet förbrukats, återigen dela sig och bilda nya merozoiter. Alternativt kan de bilda gametocyter istället för trofozoiter. De trofozoiter som delar sig bildar 16-32 nya merozoiter i erythrocyten som nu kallas för en schizont (Cowman och Crabb 2006). När dessa schizonter spricker infekteras nya erythrocyter. Denna intraerythrocytiska asexuella cykel tar ca 48 timmar för *P. falciparum*, *P. vivax* och *P. ovale* medan den tar 24 timmar för *P. knowlesi* och 72 timmar för *P. malariae* (Aravind *et al.* 2003). Cykeln fortgår sedan i princip så länge det finns nya erythrocyter att invadera, och det är denna del i livscykeln som är orsaken till malarias patogenitet.

Reproduktiv fas

De merozoiter som bildar gametocyter inom erythrocyterna rör sig sedan fritt omkring i blodomloppet till dess att de tas upp av en ny mygga. Väl inne i myggans mage utvecklas gametocyterna till gameter som i sin tur fuserar och bildar zygoter (se figur 2). Dessa zygoter, som även kallas ookineter, kan sedan penetrera magepitelet och bilda oocystor i vilka nya sporozoiter bildas, sporozoiter som sedan migrerar till myggans salivkörtlar för att på nytt kunna spridas till en ny värd (Cowman och Crabb 2006). Denna cykel från att myggan blivit infekterad till dess att den kan sprida smittan vidare tar cirka tio-fjorton dagar beroende på art, klimatfaktorer samt på den infekterade individens fysik (Macdonald 1952). I hur stor omfattning plasmodium påverkar myggans mortalitet vet man inte med säkerhet men studier visar på att mortaliteten ökar med densiteten bildade ookineter, det vill indirekt säga mängden gametocyter myggan får i sig vid födointag (Dawes *et al.* 2009).

Anophelesmyggans roll som spridningsvektor för malaria

Det finns många arter myggor av släktet *Anopheles*. De arter som fungerar som malariavektorer finns utspridda i tropiska, subtropiska och tempererade zoner världen över, från Sverige i norr till Sydafrika i söder (Kiszewski *et al.* 2004).

Myggornas förmåga att sprida plasmodium varierar beroende på vilken art av *Anopheles* det är samt dess geografiska förekomst. Den geografiska förekomsten av *Anopheles* kan förklaras med att olika klimatfaktorer såsom nederbörd, temperatur och luftfuktighet spelar en viktig roll för myggornas olika preferenser vad gäller fortplantningsområde (Kelly-Hope *et al.* 2009). Det har även visat sig att vissa *Anopheles*-arter kan bära på flera arter av *Plasmodium* samtidigt men att det ofta är en av dessa som dominerar när en människa smittas med flera *Plasmodium*-arter (McKenzie och Bossert 1997). Här i Skandinavien där vi främst har *Anopheles*-arten *A. messeae* som spridningsvektor, var till exempel den vanligaste orsaken till malaria *P. vivax*. Det kan dock inte uteslutas att det förekom fall av *P. falciparum* och *P. malariae* (Mendis *et al.* 2001; Kiszewski *et al.* 2004; Hulden *et al.* 2005). Anledningen till att just *P. vivax* var den dominerande arten är troligen att den har möjligheten att ge upphov till hypnozoiter, en latent form som kan ligga i dvala i människans leverceller under de kalla perioder då myggorna antingen ligger i dvala eller är oförmögna att reproducera sig. Under vinterhalvåret kunde då semiaktiva myggor i människans hem fortsätta sprida malarian mellan de olika individerna och indirekt till andra myggor och på så vis hålla epidemin vid liv tills nästföljande värmeperiod (Hulden *et al.* 2005).

Miljöfaktorer som påverkar *Plasmodiums* gametbildning i vektorn

Olika miljöfaktorer spelar också en avgörande roll för *Plasmodium* spps utveckling i vektorn. För att *Plasmodium* spp. ska kunna bilda gameter måste den omgivande temperaturen sjunka minst 5°C från människans och övriga däggdjurs ungefärliga kroppstemperatur omkring 37-39°C. Temperaturen får dock inte sjunka för mycket då lägsta temperatur för att t.ex. *P. vivax* och *P. falciparum* ska kunna utvecklas är 14,5-15°C respektive 16-19°C (Billker *et al.* 1997; Martens *et al.* 1999). En annan faktor är pH; detta måste öka från ca 7 som vi har i vår kropp till ca 8 i myggan för att gametbildning ska vara möjlig. Billker *et al.* (1997). har dock vid *in vitro* studier på *Plasmodium berghei*, som ofta drabbar gnagare, sett att det även finns faktorer i vektorn (i det här exemplet *Anopheles stephensi*), så kallade gametocytaktiverande faktorer som kan möjliggöra gametbildning även vid lägre pH än 8, åtminstone *in vitro*. Det är först när dessa miljöfaktorer är tillstädes som de manliga gametocyterna kan uttrycka flageller för

att kunna driva sig framåt och på så vis komma i kontakt med de honliga gametocyterna för att fusera (Billker *et al.* 1997).

Symptom vid malariainfektion

Symptomen vid malariainfektion varierar från person till person beroende på individens fysiska tillstånd och ålder samt vilken art av *Plasmodium* individen smittats med. Inkubationstiden till dess att symptom uppkommer varierar beroende på art. I normala fall tar det ca 11 dagar för *P. falciparum* och 15-16 dagar för de andra arterna (Trampuz *et al.* 2003). Detta gäller i normala fall, och individens tidigare hälsa och motståndskraft spelar självklart också en avgörande roll för hur fort individen insjuknar. Malaria delas ofta upp i två kategorier, komplicerad och okomplicerad, utifrån hur sjukdomen yttrar sig (Dan *et al.* 2006).

Symptom vid okomplicerad malariainfektion

Symptomen vid en okomplicerad malariainfektion liknar i många fall influensa med illamående, yrsel, muskelvärk, magvärk, kräkningar, feber, frossa och utmattning som följd och malariainfektioner misstages således ofta som just influensa (Dan *et al.* 2006).

Symptom vid komplicerad malariainfektion

Vid komplicerad malariainfektion, till skillnad från en okomplicerad infektion, är patienten normalt sett inte vid medvetande, alternativt vaggar patienten in och ut ur medvetslöshet. Multiorgansvikt, njursvikt, lungödem, anemi, andningsstillestånd, hypoglykemi (låg blodsockerhalt) och koma (vid cerebral malaria) är några av de symptom som kan uppstå vid en komplicerad malariainfektion (Niloofer *et al.* 2004; Dan *et al.* 2006). Det är i regel arten *P. falciparum* som är inblandad vid komplicerade/allvarliga malariainfektioner (WHO 2010a). Det har dock visat att även *P. knowlesi*, som normalt förekommer hos krabbnakaker (*Macaca fascicularis*), kan orsaka allvarligare komplikationer (Cox-Singh *et al.* 2008). I en fallstudie från Malaysia utförd av Daneshvar *et al.* (2009) visade det sig att uppemot 10 % av alla registrerade *P. knowlesi*-fall mellan 2006 och 2008 i staten Sarawak gav upphov till komplicerade sjukdomsförlopp.

Diagnos

Det finns idag flera olika metoder att diagnostisera misstänkt smittade malariapatienter och fler potentiella metoder testas för att göra proceduren så enkel, effektiv och billig som möjligt. Polymeraskedjereaktionsteknik kan självklart användas för att diagnostisera malaria men detta kräver stora resurser och avancerad utrustning som vanligtvis inte finns tillgänglig i de områden som är värst drabbade, det vill säga fattiga länder i tropikerna. Därför ges detta inte utrymme i det här arbetet. Nedan följer istället de diagnostiska metoder som är de vanligaste och mest tillgängliga.

Mikroskopiskt test

Den klassiska metoden för att avgöra huruvida en person är smittad eller ej är att undersöka förekomst av parasiten i ett blodprov från den misstänkt infekterade. Blodet stryks ut på ett provglas som varpå olika inmärkningssubstanser tillsätts för att märka in eventuellt förekommande plasmodium som sedan kan observeras i ett mikroskop. De vanligaste inmärkningssubstanserna är Field eller Giemsa vilka båda bland annat innehåller färgämnet

metylenblått som färgar in plasmodiets DNA. Metoden är mycket tillförlitlig om den utförs av en erfaren person med ett bra mikroskop. Nackdelarna med metoden är dock att många hårt malariadrabbade områden, som ligger på landsbygden och i fattiga länder, inte alltid har mikroskop eller utbildad personal till sitt förfogande eller i tillräckligt stor utsträckning för att kunna reda ut alla misstänkta fall. (Warhurst och Williams 1996)

Diagnostiskt snabbtest

Det finns idag drygt ett fyrtiotal olika diagnostiska snabbtest som detekterar närvaro av olika plasmodium-proteiner med hjälp av monoklonala antikroppar. En variant av monoklonala antikroppar påvisar närvaro av parasitens laktatdehydrogenas (pLDH) och kan avgöra vilken art av *Plasmodium* som individen är smittad med då pLDH skiljer sig mellan de olika arterna av *Plasmodium* (WHO 2008) (McCutchan *et al.* 2008). Ytterligare en variant visar om det finns histidinrikt protein 2 (HRP-2) i provet, vilket är specifikt för *P. falciparum* (WHO 2008). Monoklonala antikroppar mot enzymet aldolas, som är specifikt för *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* och *P. ovale*, är också en vanlig testparameter. Snabbtesterna kan utformas för att testa för en eller flera av de ovannämnda antigenerna (WHO 2008).

Snabbtesterna är förhållandevis små till storleken, och kommer i form av engångstickor, kassetter eller kort. Det enda som krävs för att utföra ett test är ett prov, i form av en droppe blod, samt en buffertlösning. Testen är relativt snabba och tar ca 10-15 minuter. Vad gäller prestationsförmågan så visade WHO:s utvärdering att många snabbtest hade låg träffsäkerhet när prov med låg parasitetdensitet kontrollerades medan de allra flesta hade god träffsäkerhet vid prov med hög parasitetdensitet (WHO 2008). I en studie av Gamboa *et al.* (2010) på *P. falciparum* i Peru visade det sig att vissa stammar saknade generna *pfhrp2* respektive *pfhrp3* som kodar för proteinet HRP-2. Gamboa *et al.* (2010) rekommenderar att snabbtester baserade på pLDH och aldolas bör användas i regionen och att vidare studier på *P. falciparum* i närliggande regioner bör göras för att feldiagnostisering inte ska uppstå. Fördelarna med snabbtesterna är många då det inte krävs någon direkt utbildning för att utföra testet, samt att de är lätta att distribuera. Priset är det som är den stora nackdelen då testen kostar mellan 0,45 US\$ och 2,60 US\$ styck beroende på utförande, typ och fabrikat (WHO 2004).

Immunförsvarets verkningsmekanism

Immunförsvaret är uppdelat i två delar, the adaptiva respektive det ospecifika immunförsvaret. Båda delarna utgörs av en rad olika effektorceller (leukocyter) och effektorproteiner.

Det ospecifika immunförsvaret

Det ospecifika immunförsvaret utgörs av (i) effektorceller som fagocyter och naturliga mördar celler (NK-celler), (ii) fysiska barriärer som epitelceller, intraepitellymfocyter, katelicidiner och defensiner, (iii) olika effektorproteiner i form av komplement, mannosbindande lektin och C-reaktivt protein, samt (iv) cytokiner. Detta ospecifika försvar är kroppens första skydd mot infektioner och det saknar minne. Det kan alltså inte känna igen en patogen det tidigare stött på, till skillnad från det specifika immunförsvaret. (Abbas *et al.* 2009)

Effektorceller

Fagocyterna utgörs av makrofager och neutrofiler vilka fagocyterar patogener och neutraliserar dessa med hjälp av olika enzymer och reaktiva syrearter. NK-celler är

cytotoxiska celler som transporteras runt i blodomloppet och dödar celler som har blivit infekterade eller inte fungerar som de ska. (Abbas *et al.* 2009)

Fysiska barriärer

De fysiska barriärerna består av epitelceller som fungerar likt en skiljevägg mellan den omgivande miljön och den egna vävnaden, vilket gör det svårare för olika mikrober att ta sig in. I epitelet sitter intraepitellymfocyter som tros döda mikrober de stöter på. Epitelceller kan även utsöndra antibiotiska ämnen som katelicidiner och defensiner som dödar mikrober i deras närhet. (Abbas *et al.* 2009)

Effektorproteiner

En typ av effektorproteiner som det ospecifika immunförsvaret besitter är så kallade komplementproteiner. Dessa spelar en viktig roll i vad som kallas komplementsystemet, som kan döda mikrober genom att bilda ett membranattackkomplex (MAC) som gör ett hål i mikroben så att extracellulärt material kan strömma in och intracellulärt material strömmar ut. Några komplementproteiner som C3a och C5a har dessutom en inflammatorisk effekt och många kan även opsonisera, täcka, mikrober så att de inte kan binda till något. Effektorproteinerna mannosbindande lektin och C-reaktivt protein kan också opsonisera och aktivera komplementsystemet. (Abbas *et al.* 2009)

Cytokiner

Det ospecifika immunförsvaret kan även utsöndra cytokiner, en sorts signalmolekyler som kan ge olika immunceller diverse uppgifter för att upp- respektive nedreglera hela, eller specifika delar av det ospecifika immunförsvaret. (Abbas *et al.* 2009)

Det specifika immunförsvaret

Det specifika immunförsvaret kallas även för det adaptiva immunförsvaret då det kan minnas specifika antigener för att kunna ta hand dem vid en upprepad infektion och svara snabbare. En viktig del i det adaptiva immunförsvaret är antigenpresenterande celler (APC) som till exempel dendritceller och makrofager som egentligen tillhör det ospecifika immunförsvaret. Dessa APC kan hitta mikrober, bryta ner dem i mindre beståndsdelar och sedan presentera olika antigen för T- och B-celler (lymfocyter) som i sin tur aktiveras och svarar genom cellmedierad immunitet (CMI) eller humoral immunitet (HIS) beroende på vilken typ lymfocyt som antigenet presenteras för. (Abbas *et al.* 2009)

CMI utgörs av CD8+ cytotoxiska T-celler (CTL) respektive CD4+ T-hjälparceller (THC) samt regulatoriska T-celler. CTL som kommer i kontakt med antigen genom APC och aktiveras kan sedan hitta infekterade celler och mikrober som har detta antigen varpå de dödar dessa med hjälp toxiner. Vid direktkontakt med en infekterad cell kan även apoptos induceras genom interaktion med en dödsreceptor. (Abbas *et al.* 2009)

THC som kommer i kontakt med antigen via APC kan sedan presentera antigenet för CTL eller B-celler. THC som får antigen presenterat via makrofager kan även ge dessa makrofager en signal om att döda alla mikrober den fagocyterat. THC kan delas upp i tre subkategorier, Th1, Th2 och Th17 där THC av Th1-typ producerar cytokiner som främjar inflammation och fagocytisk aktivitet speciellt vid intracellulära infektioner. THC av Th2-typ utsöndrar cytokiner som stimulerar produktionen av IgE antikroppar samt aktiverar eosinofiler och mastceller som släpper ut toxiner vilket främjar bekämpningen av större patogener som inte

kan fagocyteras. Th17-typen av THC frigör cytokiner som ger en ökad respons från bland annat neutrofiler vid infektioner med extracellulära mikrober. (Abbas *et al.* 2009)

HMI erhålls genom B-celler. Dessa B-celler kan producera fem olika antikroppar, en adhesiv molekyl som kan modifieras för att binda till ett specifikt antigen, nämligen IgA, IgD, IgE, IgG och IgM. Dessa kan alla modifieras för att binda till ett och samma antigen. Det som skiljer dem åt är dess struktur och var de vanligtvis förekommer i kroppen. Antikroppar hjälper immunförsvaret exempelvis genom att binda till antigen vilket gör att fagocyter lättare hittar och kan fagocytera mikroben. Antikroppar kan även, som tidigare sagts, aktivera komplementsystemet samt täcka viktiga strukturer hos mikroben så att den oskadliggörs. (Abbas *et al.* 2009)

Hur immunförsvaret reagerar på plasmodium

Vid infektion med plasmodium beror immunförsvarets verkningsmekanism på vilken fas parasiten befinner sig i då de olika faserna kräver olika strategier. De undersökningar som gjorts på immunförsvarets roll vid malariainfektion är till stor del baserade på studier hos djur. Stora delar av immunförsvarets verkningsmekanismer mot malaria är okända och detta är en av anledningarna till att det är svårt att ta fram ett vaccin med bra skydd.

Immunförsvarets verkan vid pre-erytrocytisk fas

Romero *et al.* (1989) upptäckte vid en studie på möss infekterade med *P. berghei* att cytotoxiska T-celler kan känna igen specifika epitoper hos circumsporozoitproteinet och att det räcker med att de cytotoxiska T-cellerna endast känner igen en enda av dessa för att skydd mot infektionen ska uppstå. Även sporozoitantigenen TRAP har blivit identifierad som potentiellt mål för cytotoxiska T-celler (Khusmith *et al.* 1991). Cytotoxiska T-celler och cytokinen interferon gamma (INF- γ) verkar vara några av de viktigaste immunlogiska försvararna mot pre-erytrocytiska former av plasmodium då Schofield *et al.* (1987) utförde ett experiment som visade att möss var mottagliga för *P. berghei* infektion om CTL saknades men inte om THC saknades. Detta betyder dock inte att THC är verkningslöst vid plasmodiuminfektion då THC fortfarande hjälper till att aktivera B-celler för antikroppsproduktion (Abbas *et al.* 2009). THC specifika för en epitop hos circumsporozoitproteinet hos *P. yoelii* har i en studie visat sig vara aktiva i bekämpningen av sporozoitinfektion men vilken subtyp av THC det rörde sig om och via vilken mekanism de förhindrade sporozoitinfektionen är dock inte känd (Renia *et al.* 1993).

Immunförsvarets verkan vid erytrocytisk fas

Antikroppar verkar spela en avgörande roll vid bekämpningen plasmodium i erytrocytisk fas. Ett exempel på detta är att John *et al.* (2004) hittat antikroppar mot en epitop hos merozoitytprotein 1 (MSP-1) som visat sig kunna blockera *P. falciparum*-infektion. En liknande studie utförd av Whoelbier *et al.* (2010) visade att antikroppar mot MSP-1 samt MSP 6 & 7 också kunde förhindra invasion av röda blodkroppar. Även THC verkar dock spela en viktig roll vid partiell immunitet, Langhorne *et al.* (1998) visade till exempel att knockoutmöss som inte kunde producera B-celler kunde kontrollera en infektion med *Plasmodium chabaudi* genom THC och en Th1-respons med produktion av INF- γ . Mössen klarade dock inte av att utveckla immunitet utan B-celler, vilket innebär att antikroppar krävs för att förskaffa sig immunitet. Detta tyder på att THC kan spela en stor roll då en förskjutning av THC responsen mot Th2 ger en ökad antikroppsproduktion som följd (Langhorne *et al.* 1998).

Plasmodium undviker immunförsvaret

Plasmodium spp. har, under evolutionens gång, utvecklat olika mekanismer för att undvika immunförsvaret och detta är en av de bidragande orsakerna till att immunförsvaret har svårt att utveckla immunitet och att bromsa infektionen av plasmodium. Nedan följer några av de anpassningar de har som vilseleder immunförsvaret.

Erythrocytadhesion

P. falciparum har, till skillnad från de andra människoinficerande arterna av *Plasmodium*, möjligheten att binda de röda blodkroppar den infekterar till endotelceller i det vaskulära systemet samt till andra icke-inficerade röda blodkroppar (rosetting) (Craig och Scherf 2001). Detta gör den genom att modifiera erythrocyten så att den uttrycker proteinet *P. falciparum* erythrocytmembranprotein 1 (PfEMP 1) som binder till en rad olika adhesionsproteiner hos endotelcellerna t ex CD36, E-selektin, P-selektin, komplementreceptor 1 (CR1), intracellulär adhesions molekyl 1 (ICAM-1), vaskulär celladhesionsmolekyl 1 (VCAM-1) och trombocytendotelcelladhesionsmolekyl 1 (PECAM -1) (Viebig *et al.* 2005; Pasternak och Dzikowski 2009). Genom denna adhesion undgår de infekterade erythrocyterna eliminering av makrofager i mjälten och annan sekundär lymfoid vävnad som t.ex. lymfknutor. De infekterade röda blodkropparna utgör genom denna adhesion till endotelet ett tydligt mål för cirkulerande leukocyter (Saul 1999; Viebig *et al.* 2005). Orsaken till varför parasiten uttrycker PfEMP 1 på erythrocyternas yta är okänd men det förefaller onekligen vara en evolutionärt hållbar strategi eftersom *P. falciparum* idag ger upphov till flest fall av allvarlig, komplicerad malaria. En hypotes är dock att denna adhesion bidrar till den naturliga selektionen då *P. falciparum*-parasiter som inte uttrycker PfEMP-1 elimineras i mjälten (Saul 1999).

P. falciparum-inficerade röda blodkroppar (iRBK) har även visat sig ha förmågan att, vid direkt kontakt, aktivera endotelceller så att de ger ett ökat uttryck av vissa ligandproteiner, t.ex. ICAM-1, varvid adhesion mellan dessa och efterföljande iRBK möjliggörs. Denna aktivering av endotelet sker även normalt som ett steg vid en inflammatorisk respons för att underlätta bindning till leukocyter genom att cytokinen tumörnekrosfaktor alfa (TNF- α) frigörs. Skillnaden är dock att TNF- α ger ett ökat uttryck av ICAM-1, VCAM-1 samt E-selektin medan dessa iRBK endast verkar aktivera ICAM-1. De endotelceller som kommit i kontakt med dessa iRBK tycks även förlora förmågan att ge ett ökat uttryck av VCAM-1 samt E-selektin vid tillsats av TNF- α , något som gör det svårare för leukocyter att binda till endotelcellerna i det drabbade området. (Viebig *et al.* 2005)

*P. falciparum*s invasionvägar av erythrocyter

Det finns två olika sätt för *P. falciparum* att invadera erythrocyter, antingen genom erythrocytbindande antigen (EBA) eller genom retikulocytbindande homolog 4 (PfRh4). Dessa ligander binder till receptorer på erythrocytens yta och beroende på vilken stam av *P. falciparum* det är så binder de antingen receptorer med salicylsyra eller receptorer som saknar salicylsyra. I en *in vitro* studie av Stubbs *et al.* (2005) på *P. falciparum* stammen W2mef visade det sig dock att *P. falciparum* hade möjligheten att växla från en salicylsyraberoende till en salicylsyraberoende bindning och att denna bindningsväxling även var reversibel. Detta visade Stubbs *et al.* (2005) genom att i ett experiment slå ut genen för EBA-175, det protein som binder den salicylsyra-positiva receptorn på erythrocyten, samt ta bort eventuell salicylsyra från erythrocyterna genom att tillsätta neuraminidas. *P. falciparum*-stammen fick då ett uppregerat uttryck av proteinet PfRh4, vilket ledde till att bindning till erythrocyterna

kunde ske trots att de saknade salicylsyra. Det visade sig även att processen kan gå åt det andra hållet d.v.s. om genen för EBA-175 inte var utslagen och att uttrycket för PfRh4 då sänktes över tid om parasiterna togs från salicylsyranegativa erythrocyter till salicylsyrapositiva. Detta byte av receptor att binda till kan ge *P. falciparum* stora fördelar då det kan innebära att de inte påverkas av en eventuell strukturförändring hos en av erythrocytreceptorerna eller om antikroppar skulle uppkomma mot proteinerna EBA-175 eller PfRh4 (Stubbs *et al.* 2005).

T-cellepitopmimikry

P. falciparum har flera proteiner med mycket hög grad av polymorfi och det har visat sig att vissa av dessa proteiner kan agera ändrad peptidligand (APL) och härma epitoper som olika T-celler normalt binder till och manipulera dessa T-celler att göra olika saker. Plebanski *et al.* (1999) upptäckte att epitopen Th2R på circumsporozoitproteinet hos *P. falciparum* vid interaktion med THC kunde nedreglera dessas utsöndring av den inflammatoriska cytokinen interferon gamma (INF- γ) och istället uppreglera utsöndringen av den för immunförsvaret inhibitoriska cytokinen interleukin 10 (IL-10). Detta leder till att professionella APC hindras från att producera IL-12, en Th-1-responsinducerande cytokin, samt att dessa APC får ett minskat uttryck av co-stimulatoriska molekyler och MHC klass II (Abbas *et al.* 2009). Ett annat protein hos *P. falciparum* som visat sig ha epitoper som kan binda till och påverka T-celler negativt är MSP-1. Här är det två vanliga alleler av MSP-1 som visat sig förhindra proliferationen av både naiva THC, som inte kommit i kontakt med antigen ännu, och minnes-THC (Plebanski *et al.* 1999).

Antigenisk variation och kryptiska epitoper

P. falciparum, *P. knowlesi* och *P. vivax* har variabla regioner i sina genom vilka innehåller familjer av gener med hög grad av polymorfi för olika proteiner till exempel PfEMP-1 hos *P. falciparum*. Endast en gen ur respektive familj kan uttryckas åt gången och genom att växla mellan vilken gen som ska uttryckas kan dessa arter av *Plasmodium* modifiera ett protein så att det ser olika ut men fortfarande har samma funktion, något som kan vara fördelaktigt om exempelvis antikroppar bildats mot en variant av proteinet. (Su *et al.* 1995; Craig och Scherf 2001; del Portillo *et al.* 2001; Pasternak och Dzikowski 2009)

P. falciparum har även visat sig ha så kallade kryptiska epitoper, vilket innebär att specifika områden på några av dess proteiner döljs så att immunförsvaret inte kan reagera mot dessa områden. Dharmendar *et al.* (2005) upptäckte till exempel en kryptisk epitop hos CSP i en *in vivo* studie på möss. Där fann de endast antikroppar mot epitopen om mössen immuniserades med endast polypeptidkedjan för denna epitop och inte för hela proteinet.

Behandling

Det finns idag mängder av läkemedel mot malaria att tillgå. Det finns rekommendationer från WHO om vilken typ av preparat som bör användas vid infektion av olika arter av *Plasmodium* då verkningsgraden för de olika läkemedlen varierar. Vad som ordineras beror slutligen på en rad olika faktorer som individens ålder, hälsa samt var individen blev smittad, då olika områden är olika drabbade av resistens.

Okomplicerad infektion med *P. falciparum*

Okomplicerad malaria orsakad av *P. falciparum* behandlas idag främst genom kombinationsbehandlingar, antingen med eller utan artemisinin

Artemisininbaserad kombinationsbehandling

Artemisininbaserad kombinationsbehandling (ACT) är idag den vanligaste metoden att behandla okomplicerad malaria orsakad av *P. falciparum* (WHO 2010b). Artemisinin kommer från växten sommarmalört (*Artemisia annua*, L) och flera derivat, det vill säga ämnen med små strukturella förändringar som raffinerats ut från artemisinin, som artesunat, artemeter och dehydroartemisinin har tagits fram för att öka dess potential (Balint 2001). Artemisins verkningsmekanism är ännu inte helt klarlagd. Det verkar som om att plasmodium i erytrocytisk fas bryts ned av de fria radikaler som bildas då artemisininets endoperoxidbrygga bryts upp av hemjärn, något det kommer i kontakt med inuti plasmodium som metaboliserat hemoglobin (Meshnick 2002). ACT innebär att artemisinin eller något av dessa derivat ges tillsammans med ett annat läkemedel för malaria som har en annan verkningsmekanism, vanligtvis amodiakin, lumefantrin, meflokin, sulfadoxin-pyrimetamin eller piperakin vid en okomplicerad infektion (WHO 2010b).

Kombinationsbehandlingar som inte är baserade på artemisinin

Det finns kombinationsbehandlingar som inte inkluderar artemisinin. Dessa behandlingar är baserade på kinoliner, alkaloider som utvunnits ur kinaträd (*Cinchona spp.*). Kinolinernas verkningsmekanism är ännu inte helt klarlagd men verkar hindra plasmodium i erytrocytisk fas från att endocytera hemoglobin och störa vesikeltransporten av hemoglobin inom parasiten (Roberts *et al.* 2008). Två exempel på behandlingar utan artemisinin är klorokin tillsammans med sulfadoxin-pyrimetamin eller amodiakin tillsammans med sulfadoxin-pyrimetamin (WHO 2010b). Sulfadoxin-pyrimetamin påverkar plasmodium genom att blockera två enzymer som krävs för syntes av folsyra, vilket är viktigt för att bland annat kunna syntetisera och reparera DNA (Yuthavong 2002).

WHO rekommenderar dock inte längre denna form av kombinationsbehandling utan artemisinin eller artemisininderivat då resistensen har blivit så stor mot dessa läkemedel i vissa områden att de inte längre kan garantera en effektiv behandling. (WHO 2010b)

Komplicerad infektion med *P. falciparum*

Komplicerad malaria orsakas, som tidigare nämnts, oftast av *P. falciparum* och de rekommendationer som finns från WHO är att i första hand behandla med artesunat som ges intravenöst eller intramuskulärt, alternativt ges kinin om artesunat inte finns tillgängligt. Detta görs under de första 24 timmarna av behandlingen då läget är som mest kritiskt. Efter de första 24 timmarna kan olika ACT ges som fortsatt behandling till dess patienten tillfrisknar. (WHO 2010b)

Behandling av de mer benigna parasiterna *P. malariae*, *P. ovale* och *P. vivax*

Vid infektion med *P. malariae*, *P. ovale* och *P. vivax* är utgången oftast en okomplicerad infektion och de behandlingsformer som rekommenderas vid en okomplicerad infektion av dessa arter är att ge klorokin. *P. vivax* som också, i sällsynta fall, kan ge upphov till komplicerade infektioner bör enligt WHO behandlas på samma sätt som en komplicerad *P. falciparum*infektion. *P. ovale*- och *P. vivax*infektion ska även behandlas med primakin efter tillfrisknande i fjorton dagar för att förhindra återfall på grund av latent hypnozoiter. ACT behandling är även effektivt mot dessa arter av *Plasmodium* men bör endast ges vid *P. vivax*

infektion i områden där klorokinresistens förekommer för att förhindra ytterligare resistens. *P. vivax* har även visat sig vara resistent mot sulfadoxin-pyrimetamin i många områden och ACT innehållande sulfadoxin-pyrimetamin bör således inte användas i de områden där denna resistens förekommer. (WHO 2010b)

Behandling av *P. knowlesi*

Det finns idag inga rekommendationer för hur *P. knowlesi* bör behandlas, Cox-Singh *et al.* (2008) förslår dock att *P. knowlesi*-infektioner bör tas på största allvar och behandlas på samma sätt som en komplicerad *P. falciparum*-infektion.

Nya läkemedel och framställningsmetoder

För att motverka resistens och öka tillgängligheten för malariamediciner krävs forskning på nya potentiella läkemedel samt nya metoder att ta fram dessa. Ro *et al.* (2006) som forskar inom syntetisk biologi tog år 2006 fram en ny metod att framställa artemisinin. Genom att genmodifiera jästceller av arten *Saccharomyces cerevisiae* kunde de få dessa att producera artemisininsyra, en prekursor till artemisinin som enkelt kan omvandlas till just artemisinin eller olika artemisininderivat (Ro *et al.* 2006). Studier på nya läkemedel görs också och Kumar *et al.* (2009) har tagit fram flera nya föreningar baserade på 9-anilinoakridintriaziner som med gott resultat i *in vitro* studier neutraliserat *P. falciparum*-stammen 3D7. Två av föreningarna visade sig även ha mycket hög potential mot en klorokinresistent stam av *P. yoelii* vid en *in vivo*-studie på möss. Hur föreningar baserade på 9-anilinoakridintriaziner verkar mot plasmodium är inte helt klarlagt ännu men det har föreslagits att de eventuellt kan (i) binda till hemgrupper och hindra plasmodiums upptag av hemoglobin, (ii) inhibera enzymet topoisomeras II som är delaktigt vid utvecklandet av DNA, vilket krävs för att translation ska vara möjligt, eller (iii) interkalera i DNAt, vilket betyder att plasmodiets DNA får en strukturförändring genom att 9-anilinoakridintriaziner kan binda till det (Kumar *et al.* 2009).

Resistens mot malariamediciner

Resistens mot malariamediciner är idag ett växande problem. Resistens mot klorokin, sulfadoxin-pyrimetamin, kinin började upptäckas redan på 1950- och 1960-talet och resistens mot andra läkemedel har också uppstått på flera platser sedan dess (Hyde 2005). Artemisinbaserade läkemedel har länge varit den behandlingsform som klarat sig från resistens och kunnat fungera som en sista utväg. Nu har dock resistens mot artemisininderivatet artesunat börjat uppstå. Detta observerades vid en fallstudie av Dondorp *et al.* (2009) på *P. falciparum*-infekterade individer i västra Kambodja och i nordvästra Thailand. De infekterade individerna i västra Kambodja hade en mycket längre infektionsperiod än de från nordvästra Thailand när ACT baserat på artesunat-meflokin gavs, vilket indikerar att resistens har börjat uppstå i västra Kambodja.

Vaccinstudier

Det finns idag inget vaccin mot malaria men mycket forskning görs på såväl nya som gamla typer av vaccin och alternativa infallsvinklar undersöks.

Det vaccin som ser mest lovande ut idag är GlaxoSmithKlines RTS, S vaccin som har utvecklats under drygt 20 år och som just nu befinner sig i steg tre av kliniska försök vilket innebär att det börjat testats på människor (CDC 2010c). Vaccinet består av två sammanslagna proteiner, RTS och S, som framställts genom att olika genetiska sekvenser inkorporerats i jästcellers (*S. cerevisiae*) kromosomer. RTS-proteinet är ett fusionsprotein som utgörs av (i) en repetitiv gensekvens som kodar för en del av CSP hos *P.falciparum*stammen 3D7 (R), (ii) gensekvenser för T-cellsepitoper hos CSP (T), samt (iii) gensekvensen för ytproteinet HBsAg från Hepatit B-virus (S) (Stoute *et al.* 1997; GlaxoSmithKline 2008).

S-proteinet är ett ofuserat protein som utgörs av gensekvensen för ytproteinet HBsAg från hepatit B-virus (S). RTS och S proteinerna bildar sedan ett komplex med varandra inom jästcellerna och det är detta RTS, S komplex som vaccinet bygger på och därav namnet (Stoute *et al.* 1997; GlaxoSmithKline 2008). Vaccinet tillsätts sedan en adjuvant, det vill säga ett ämne som stimulerar immunförsvaret för att responsen mot vaccinets komponenter ska amplificeras. Flera olika adjuvanter har testats i olika kliniska försök (Stoute *et al.* 1997). Målet med vaccinet är att kroppen skall bilda antikroppar och T-celler med hög affinitet för olika epitoper på CSP. Antikroppar mot CSP hindrar sporozoiterna från att kunna tränga in i hepatocyterna samt gör att de hepatocyter som redan är infekterade kan kännas igen och förstöras av T-celler. Anledningen till att Hepatit B antigenet HBsAg används i vaccinet är för att stärka kroppens reaktion mot CSP då CSP i sig självt inte har tillräckligt hög immunogenicitet (Stoute *et al.* 1997). RTS, S-vaccinet testat med adjuvanten AS01E har visat sig ge relativt goda resultat. Vaccinet testades på barn i åldrarna 5-17månader och uppvisade en effektivitet på 56 % (Bejon *et al.* 2008).

Vaccin som bygger på virala vektorer har också visat sig kunna frambringa skydd mot *P. falciparum*-malaria. Den första fas två-studien av denna typ av vaccin som visade sig ha effektivitet var vaccinprototypen NYVAC-Pf7. Vaccinet bygger på vacciniaviruset NYVAC, i vars genom Ockenhouse *et al.* (1998) inkorporerat sju *P. falciparum*gener och sedan avdödat det. De *P. falciparum*gener från stammen 3D7 som sattes in kodade för CSP, TRAP, antigen i parasitens leverstadium (LSA-1), serinrepetitivt antigen (SERA), MSP-1 och AMA-1. Även om vaccinet bara gav en av 35 försökspersoner immunitet så framkallade vaccinet antikroppsproduktion mot de olika antigenerna hos mer än 90 % av försökspersonerna och visade på att vacciner med virala vektorer kan vara värda att titta närmare på. Draper *et al.* (2009) har i en studie på möss infekterade med *P. yoelii* visat att en ny vaccinationsmetod med virala vektorer kan vara lönsamt att forska vidare på. Deras vaccinationsmetod utnyttjade humant adenovirus serotyp 5 (AdHu5) tillsammans med vacciniaviruset Ankara (MVA), båda genmodifierade för att uttrycka olika epitoper av MSP-1 och resultaten från studien visar att metoden kan ge en stark immunrespons mot MSP-1 i form av både antikroppar och T-celler och att metoden ger effekt mot plasmodium både i pre-erytrocytisk fas och erytrocytisk fas.

En annan metod som kan ha stor potential är att kombinera proteinvacciner med vacciner som baseras på virala vektorer. Hutchings *et al.* (2007) testade detta genom att infektera möss med sporozoiter av *P. berghei*, varpå de immuniserade dessa med en kombination av hönskoppsvirusstammen FP9, MVA och proteinvaccinet CV-1866. Alla vaccindelarna hade

genmodifierats för att uttrycka CSP och de virala vaccinen testades tillsammans i en grupp möss medan en grupp testades enbart med proteinvaccinet som kontroll. De två olika kontrollgrupperna gav cytotoxisk T-cell-respons respektive antikroppsrespons medan de möss som fått en blandning av de olika komponenterna uttryckte både en cytotoxisk T-cell- och en antikroppsrespons. Både den cytotoxiska T-cell-responsen och antikroppsresponsen i den gruppen som fick en kombination av de olika komponenterna var starkare än hos kontrollgrupperna. Proteinvaccinet gav ett 12-procentigt skydd, FP9 och MVA gav tillsammans ett 37-procentigt skydd medan det kombinerade vaccinet gav ett 90-procentigt skydd mot infektion av *P. berghei*.

Diskussion

Malaria är idag på tillbakagång, men utbredning över större områden skulle dock kunna inträffa i framtiden med tanke på de klimatförändringar vi upplever. Varför malaria försvann från Europa och Nordamerika vet man inte men det tros bero på flera faktorer som har med ökad välfärd att göra. Bättre isolerade hus och utdikning av våtmarker antas ha spelat en avgörande roll (Hulden *et al.* 2005). Klimatet vid början av 1900-talet var av mindre betydelse då till exempel *P. vivax* kunde spridas trots de stora växlingarna i klimatet vi har här i Skandinavien. Skulle dock medeltemperaturen öka så skulle det innebära en tänkbart längre tidsperiod under vilken plasmodium kan spridas, något som även skulle gälla för myggan. Detta skulle innebära att det blir svårare att bromsa eventuella utbrott av malaria.

Forskningen på nya malariamediciner och vacciner går snabbt framåt just nu och nya angreppspunkter upptäcks hela tiden. Denna forskning kommer precis i rätt tid då resistens mot olika malariamediciner snabbt sprider sig. Nya metoder för att få ner kostnaderna behövs också för att minska antalet dödsfall i malaria, då priserna för malariamediciner idag är för höga för många fattiga länder vilket gör att medicinerna inte når ut till alla. Framställningen av semisyntetiskt artemisinin kan komma att få en oerhört stor betydelse. En massproduktion av semisyntetiskt artemisinin skulle sänka priset på artemisininbaserade kombinationsbehandlingar radikalt vilket i sin tur skulle innebära att eventuell spridning av resistens mot artemisinin skulle bromsas något. Detta på grund av att fler patienter skulle ha råd att fullfölja behandlingen istället för att avbryta den och spara tabletter för framtida bruk. En reducerad kostnad för malariamediciner skulle även ge flera utvecklingsländer stor ekonomisk hjälp då vissa hårt drabbade länder fått sin ekonomiska tillväxt sänkt med så mycket som 1,3 % till följd av dyra inköp av malariamediciner (WHO 2009). Det är också viktigt att forskning på olika plasmodium-proteiner ges mer uppmärksamhet och att *Plasmodium* spps livscykel och immunflyktsmekanismer studeras närmare för att upptäcka nya angreppspunkter som kan öka effektiviteten hos potentiella vaccin eller läkemedel. Ett potent vaccin kan komma att bli ett måste inom en snar framtid om resistens mot artemisinin och artemisininderivat skulle bli utbrett.

Tack

Jag vill tacka min handledare Karin Carlsson för hennes värdefulla kommentarer och uppmuntring. Jag vill även rikta ett stort tack till mina medstudenter Hanna Lindberg, Miriam Ramliden och Lovisa Wretman för deras återkoppling under skrivandeprocessen.

Referenser

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2009. Cellular and molecular immunology. 6:e upplagan uppdaterad s: 27-29, 49-50, 56, 116-117, 227, 309-312, 314-315, 317-318, 323-324, 332, 335-338. Elsevier Inc. Kina.
- Adams, J. H., Hudson, D. E., Torii, M., Ward, G. E., Wellems, T. E., Aikawa, M. och Miller, L. H. 1990. The Duffy receptor family of Plasmodium knowlesi is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell* **63**: 141-153.
- Aikawa, M., Miller, L. H., Johnson, J. och Rabbege, J. 1978. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *The Journal of Cell Biology* **77**: 72-82.
- Aravind, L., Iyer, L. M., Wellems, T. E. och Miller, L. H. 2003. Plasmodium Biology: Genomic Gleanings. *Cell* **115**: 771-785.
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S. H. I., Schnieder, T. och Frevert, U. 2007a. Release of Hepatic Plasmodium yoelii Merozoites into the Pulmonary Microvasculature. *PLoS Pathog* **3**.
- Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson, A. B., Jr. , Van Rooijen, N., Schnieder, T. och Frevert, U. 2007b. Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver. *Cellular Microbiology* **9**: 397-412.
- Balint, G. A. 2001. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacology & Therapeutics* **90**: 261-265.
- Bejon, P., Lusingu, J., Olotu, A., Leach, A., Lievens, M., Vekemans, J., Mshamu, S., Lang, T., Gould, J. och Dubois, M. C. 2008. Efficacy of RTS, S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *The New England journal of medicine* **359**: 2521-2532.
- Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G. och Sinden, R. E. 1997. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of Plasmodium berghei in vitro. *Parasitology* **115**: 1-7.
- Brimelow L. 2006. Free World Map Illustrator File. WWW-dokument 2006-02-15: <http://theflashblog.com/?p=144>. Hämtad 2010-05-04.
- Camus, D. och Hadley, T. J. 1985. A Plasmodium falciparum antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science* **230**: 553-556.
- CDC. 2010a. Anopheles Mosquitoes. WWW-dokument 2010-02-08: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>. Hämtad 2010-04-17.
- CDC. 2010b. CDC Malaria Map Application. WWW-dokument 2010-02-08: <http://cdc-malaria.ncsa.uiuc.edu/index.php>. Hämtad 2010-05-04.
- CDC. 2010c. Malaria Vaccine. WWW-dokument 2010-02-08: <http://www.cdc.gov/malaria/features/vaccines.html>. Hämtad 2010-05-20.
- Cowman, A. F. och Crabb, B. S. 2006. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* **124**: 755-766.
- Cox-Singh, J., Davis, T. M. E., Lee, K.-S., Shamsul, S. S. G., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H. A., Conway, D. J. och Singh, B. 2008. Plasmodium knowlesi Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. *Clinical Infectious Diseases* **46**: 165-171.
- Craig, A. och Scherf, A. 2001. Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Molecular and Biochemical Parasitology* **115**: 129-143.
- Dan, W., Nick, B. och David, L. 2006. Malaria: clinical features and recommended management. *Prescriber* **17**: 44-52.

- Daneshvar, C., Davis, T. M. E., Cox-Singh, J., Rafa'ee, M. Z., Zakaria, S. K., Divis, P. C. S. och Singh, B. 2009. Clinical and Laboratory Features of Human Plasmodium knowlesi Infection. *Clinical Infectious Diseases* **49**: 852-860.
- Dawes, E., Churcher, T., Zhuang, S., Sinden, R. och Basanez, M.-G. 2009. Anopheles mortality is both age- and Plasmodium-density dependent: implications for malaria transmission. *Malaria Journal* **8**: 228.
- del Portillo, H. A., Fernandez-Becerra, C., Bowman, S., Oliver, K., Preuss, M., Sanchez, C. P., Schneider, N. K., Villalobos, J. M., Rajandream, M.-A., Harris, D., da Silva, L. H. P., Barrell, B. och Lanzer, M. 2001. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of Plasmodium vivax. *Nature* **410**: 839-842.
- Dharmendar, R., Rana, N., Dewal, J., Rana, C., Patricia de la, V., Sanjai, K. och Thomas, F. M. 2005. An Immunologically Cryptic Epitope of Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein Facilitates Liver Cell Recognition and Induces Protective Antibodies That Block Liver Cell Invasion. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 20524-20529.
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Arie, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S. S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N. P., Lindegardh, N., Socheat, D. och White, N. J. 2009. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *N Engl J Med* **361**: 455-67.
- Draper, S. J., Goodman, A. L., Biswas, S., Forbes, E. K., Moore, A. C., Gilbert, S. C. och Hill, A. V. S. 2009. Recombinant viral vaccines expressing merozoite surface protein-1 induce antibody- and T cell-mediated multistage protection against malaria. *Cell Host & Microbe* **5**: 95-105.
- Frevort, U., Engelmann, S., Zougbedé, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L. och Yee, H. 2005. Intravital Observation of Plasmodium berghei Sporozoite Infection of the Liver. *PLoS Biol* **3**: e192.
- Galinski, M. R., Medina, C. C., Ingravallo, P. och Barnwell, J. W. 1992. A reticulocyte-binding protein complex of Plasmodium vivax merozoites. *Cell* **69**: 1213-1226.
- Gamboa, D., Ho, M. F., Bendezu, J., Torres, K., Chiodini, P. L., Barnwell, J. W., Incardona, S., Perkins, M., Bell, D. och McCarthy, J. 2010. A Large Proportion of P. falciparum Isolates in the Amazon Region of Peru Lack pfhrp2 and pfhrp3: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Plos One* **5**: e8091.
- GlaxoSmithKline. 2008. Developing GSK's RTS,S/AS01 candidate malaria vaccine. WWW-dokument 2009-01: <http://www.eurekalert.org/RTSSmalariaVaccine/2009/docs/DevelopingRTSS.pdf>. Hämtad 2010-06-01
- Holder, A. A. och Blackman, M. J. 1994. What is the function of MSP-I on the malaria merozoite? *Parasitology Today* **10**: 182-184.
- Hulden, L., Hulden, L. och Heliovaara, K. 2005. Endemic malaria: an 'indoor' disease in northern Europe. Historical data analysed. *Malaria Journal* **4**: 19-31.
- Hutchings, C. L., Birkett, A. J., Moore, A. C. och Hill, A. V. S. 2007. Combination of protein and viral vaccines induces potent cellular and humoral immune responses and enhanced protection from murine malaria challenge. *Infection and immunity* **75**: 5819-5826.
- Hyde, J. E. 2005. Drug-resistant malaria. *Trends in Parasitology* **21**: 494-498.
- Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y. och Yuda, M. 2004. Cell-Passage Activity Is Required for the Malarial Parasite to Cross the Liver Sinusoidal Cell Layer. *PLoS Biol* **2**: e4.
- John, C. C., O'Donnell, R. A., Sumba, P. O., Moormann, A. M., de Koning-Ward, T. F., King, C. L., Kazura, J. W. och Crabb, B. S. 2004. Evidence That Invasion-Inhibitory Antibodies Specific for the 19-kDa Fragment of Merozoite Surface Protein-1 (MSP-119) Can Play a

- Protective Role against Blood-Stage Plasmodium falciparum Infection in Individuals in a Malaria Endemic Area of Africa. *J Immunol* **173**: 666-672.
- Kelly-Hope, L., Hemingway, J. och McKenzie, F. E. 2009. Environmental factors associated with the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in Kenya. *Malaria Journal* **8**: 268.
- Khusmith, S., Charoenvit, Y., Kumar, S., Sedegah, M., Beaudoin, R. L. och Hoffman, S. L. 1991. Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science* **252**: 715-718.
- Kiszewski, A., Mellinger, A., Spielman, A., Malaney, P. I. A., Sachs, S. E. och Sachs, J. 2004. A global index representing the stability of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* **70**: 486-498.
- Kumar, A., Srivastava, K., Raja Kumar, S., Puri, S. K. och Chauhan, P. M. S. 2009. Synthesis of 9-anilinoacridine triazines as new class of hybrid antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**: 6996-6999.
- Langhorne, J., Cross, C., Seixas, E., Li, C. och von der Weid, T. 1998. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1730-1734.
- Macdonald, G. 1952. The analysis of the sporozoite rate. *Trop Dis Bull* **49**: 569-86.
- Martens, P., Kovats, R. S., Nijhof, S., de Vries, P., Livermore, M. T. J., Bradley, D. J., Cox, J. och McMichael, A. J. 1999. Climate change and future populations at risk of malaria. *Global Environmental Change* **9**: S89-S107.
- McCutchan, T. F., Piper, R. C. och Makler, M. T. 2008. Use of malaria rapid diagnostic test to identify *Plasmodium knowlesi* infection. *Emerging Infectious Diseases* **14**: 1750-1752.
- McKenzie, F. E. och Bossert, W. H. 1997. Mixed-Species *Plasmodium* Infections of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **34**: 417-25.
- Mendis, K., Sina, B. J., Marchesini, P. och Carter, R. 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* **64**: 97-106.
- Meshnick, S. R. 2002. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal for Parasitology* **32**: 1655-1660.
- Miller, L. H., Mason, S. J., Dvorak, J. A., McGinniss, M. H. och Rothman, I. K. 1975. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* **189**: 561-563.
- Mitchell, G. H., Thomas, A. W., Margos, G., Dluzewski, A. R. och Bannister, L. H. 2004. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun* **72**: 154-158.
- Nilofar, R., Mats, W. och Qijun, C. 2004. Molecular aspects of malaria pathogenesis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **41**: 9-26.
- Ockenhouse, C. F., Sun, P. F., Lanar, D. E., Wellde, B. T., Hall, B. T., Kester, K., Stoute, J. A., Magill, A., Krzych, U., Farley, L., Wirtz, R. A., Sadoff, J. C., Kaslow, D. C., Kumar, S., Church, L. W. P., Crutcher, J. M., Wizel, B., Hoffman, S., Lalvani, A., Hill, A. V. S., Tine, J. A., Guito, K. P., Taisne, C., Anders, R., Horii, T., Paoletti, E. och Ballou, W. R. 1998. Phase I/IIa Safety, Immunogenicity, and Efficacy Trial of NYVAC-Pf7, a Pox-Vectored, Multiantigen, Multistage Vaccine Candidate for *Plasmodium falciparum* Malaria. *The Journal of Infectious Diseases* **177**: 1664-1673.
- Pasternak, N. D. och Dzikowski, R. 2009. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**: 1463-1466.
- Plebanski, M., Flanagan, K. L., Lee, E. A. M., Reece, W. H. H., Hart, K., Gelder, C., Gillespie, G., Pinder, M. och Hill, A. V. S. 1999. Interleukin 10-Mediated

- Immunosuppression by a Variant CD4 T Cell Epitope of *Plasmodium falciparum*. *Immunity* **10**: 651-660.
- Renia, L., Grillo, D., Marussig, M., Corradin, G., Miltgen, F., Lambert, P. H., Mazier, D. och Del Giudice, G. 1993. Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4+ T cell clones against *Plasmodium yoelii* liver stages. *J Immunol* **150**: 1471-1478.
- Richards, J. S. och Beeson, J. G. 2009. The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol* **87**: 377-390.
- Ro, D.-K., Paradise, E. M., Ouellet, M., Fisher, K. J., Newman, K. L., Ndungu, J. M., Ho, K. A., Eachus, R. A., Ham, T. S., Kirby, J., Chang, M. C. Y., Withers, S. T., Shiba, Y., Sarpong, R. och Keasling, J. D. 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **440**: 940-943.
- Roberts, L., Egan, T. J., Joiner, K. A. och Hoppe, H. C. 2008. Differential effects of quinoline anti-malarials on endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*: AAC.01478-07.
- Robson, K. J., Frevert, U., Reckmann, I., Cowan, G., Beier, J., Scragg, I. G., Takehara, K., Bishop, D. H., Pradel, G. och Sinden, R. 1995. Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *The EMBO Journal* **14**: 3883-3894.
- Romero, P., Maryanski, J.L., Corradin, G., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V. och Zavala, F. 1989. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* **341**:323-326
- Saul, A. 1999. The Role of Variant Surface Antigens on Malaria-infected Red Blood Cells. *Parasitology Today* **15**: 455-457.
- Saxby T. 2003. Mosquito 2. IAN image library. WWW-dokument 2003-01-01: <http://ian.umces.edu/imagelibrary/displayimage-search-0-4300.html>. Hämtad 2010-05-03
- Schofield, L., Villaquiran, J., Ferreira, A., Schellekens, H., Nussenzweig, R. och Nussenzweig, V. 1987. [gamma] Interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* **330**: 664-666.
- Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J. F., Prenant, M., Belnoue, E., Renia, L., Hannoun, L., Eling, W., Levy, S., Boucheix, C. och Mazier, D. 2003. Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat Med* **9**: 93-6.
- Stoute, J. A., Slaoui, M., Heppner, D. G., Momin, P., Kester, K. E., Desmons, P., Welde, B. T., Garçon, N., Krzych, U. och Marchand, M. 1997. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med* **336**: 86-91.
- Stubbs, J., Simpson, K. M., Triglia, T., Plouffe, D., Tonkin, C. J., Duraisingh, M. T., Maier, A. G., Winzeler, E. A. och Cowman, A. F. 2005. Molecular Mechanism for Switching of *P. falciparum* Invasion Pathways into Human Erythrocytes. *Science* **309**: 1384-1387.
- Su, X. Z., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P., Guinet, F., Herrfeldt, J. A., Peterson, D. S., Ravetch, J. A. och Wellems, T. E. 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* **82**: 89-100.
- Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I. och Prabhu, R. M. 2003. Clinical review: Severe malaria. *Crit Care* **7**: 315-23.
- Warhurst, D. C. och Williams, J. E. 1996. ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *Journal of Clinical Pathology* **49**: 533-538.
- Viebig, N. K., Wulbrand, U., Forster, R., Andrews, K. T., Lanzer, M. och Knolle, P. A. 2005. Direct Activation of Human Endothelial Cells by *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *Infect. Immun.* **73**: 3271-3277.

- WHO. 2004. Sources and Prices of Selected Products for the Prevention, Diagnosis and Treatment of Malaria. WWW-dokument 2004:
<http://www.who.int/medicines/areas/access/AntiMalariaSourcesPricesEnglish.pdf>. Hämtad 2010-05-10.
- WHO. 2010a. Malaria: Fact sheet. WWW-dokument 2010-04:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>. Hämtad 2010-04-07.
- WHO. 2010b. Guidelines for the treatment of malaria second edition. WWW-dokument 2010:
http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf. Hämtad 2010-05-18.
- WHO. 2008. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. WWW-dokument 2008:
<http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/media/press/pdf/Full-report-malaria-RDTs.pdf>. Hämtad 2010-05-09.
- Woehlbier, U., Epp, C., Hackett, F., Blackman, M. och Bujard, H. 2010. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite Plasmodium falciparum inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. *Malaria Journal* **9**: 77.
- Yuthavong, Y. 2002. Basis for antifolate action and resistance in malaria. *Microbes and Infection* **4**: 175-182.