

N

Proteksi terhadap Infeksi Malaria yang Fatal pada Mencit dengan Vaksin Malaria Stadium Darah

oleh : Supargiyono

Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Supargiyono – *Protective immune responses against fatal malarial infection in mice with blood stage malaria vaccin.*

Studies were carried out to establish suitable infection and immunization method to facilitate investigation on the protective host immune responses against acute malarial infection. Combinations of experimental model using two species of rodent malaria parasites *Plasmodium vinckei vinckei* and *Plasmodium vinckei petteri*, two immunization methods were tested, to determine which model are suitable for studying any aspect of host immune responses during protective malarial immunization.

The results indicated that the infection of *P. v. vinckei* and *P. v. petteri* in LACA or in BALB/c mice generally produce acute and lethal infections. Infection of *P. v. vinckei* in these experimental models seems more severe than *P. v. petteri*, and neither intravenous nor intraperitoneal immunization gave significant protection against homologous infection. However, immunization using 10^8 blood stage parasite *P. v. petteri* could protect LACA mice from the lethality of homologous challenge, and it seems that cell mediated mechanisms play an important role in host responses against infection. Therefore, *P. v. petteri* infection in LACA mice and immunization using 10^8 blood stage parasites given intravenously or intraperitoneally represent a suitable model to study some aspects of host immune response mechanism during malarial immunization.

Key Words : *Plasmodium vinckei vinckei* – *Plasmodium vinckei petteri* – immune response – cellular immunity – homologous parasites

PENGANTAR

Penyakit malaria sampai kini masih merupakan masalah kesehatan utama di negara beriklim tropis seperti di Indonesia. Faktor-faktor yang menyebabkan belum berhasilnya program pemberantasan penyakit tersebut diantaranya adalah karena rantai penularan dan

daur hidup parasit malaria yang sangat kompleks, serta semakin meluasnya populasi parasit yang kebal terhadap obat anti malaria dan nyamuk vektor yang kebal terhadap insektisida. Salah satu alternatif untuk menjembatani masalah tersebut adalah tindakan pencegahan terhadap terjadinya infeksi dan komplikasi infeksi malaria yang berat, yang seharusnya bisa dilakukan dengan imunisasi. Berkat kemajuan dalam bidang bioteknologi dan biologi molekular, penelitian tentang vaksin serta reaksi kekebalan terhadap infeksi malaria juga berkembang dengan pesat. Berbagai epitop yang antigenik telah banyak diidentifikasi pada permukaan parasit maupun membran eritrosit yang terinfeksi, dan struktur asam amino serta gena yang bertanggung jawab atas pembuatan molekul tersebut telah banyak diketahui (Dame *et al.*, 1985; Holder, 1988; Anders and Brown, 1990), bahkan protein rekombinan maupun sintetiknyapun telah banyak diproduksi (Collins *et al.*, 1986; Patarroyo *et al.*, 1992; Sina *et al.*, 1992). Namun demikian vaksin malaria yang secara efektif bisa melindungi tubuh terhadap infeksi dan komplikasi malaria yang berat sampai saat ini masih belum ditemukan. Hal ini disebabkan masih sangat terbatasnya informasi tentang reaksi, baik humoral maupun seluler dari sistem kekebalan tubuh yang terjadi selama infeksi malaria.

Beberapa hasil penelitian yang dilakukan baik pada manusia maupun pada hewan percobaan membuktikan bahwa selama infeksi malaria reaksi imun humoral maupun selulernya terpacu (Weidanz., 1982; Robinson *et al.*, 1992; Waki *et al.*, 1992), dan mekanisme yang berperan sebagai efektor nampaknya juga merupakan kerjasama antara kedua macam reaksi imun tersebut (Schofield *et al.*, 1987; Weiss *et al.*, 1988; Wozencraft *et al.*, 1985).

Penelitian ini bertujuan untuk mencari model infeksi dan cara imunisasi yang efektif dengan menggunakan binatang percobaan, agar bisa dipakai untuk mengkaji reaksi-reaksi imun yang terjadi selama infeksi dan mengantisipasi reaksi-reaksi mana yang bersifat protektif selama imunisasi.

BAHAN DAN CARA

Untuk mendapatkan model infeksi dan cara imunisasi yang efektif dilakukan pengujian terhadap model-model yang berupa kombinasi dengan menggunakan 2 spesies plasmodium (P_1 dan P_2), 2 galur mencit (M_1 dan M_2), dan 2 cara imunisasi (I_1 dan I_2), sehingga secara keseluruhan terbentuk 12 macam kombinasi yaitu : $P_1M_1I_1$, $P_1M_1I_2$ dan P_1M_1 (kontrol); $P_1M_2I_1$, $P_1M_2I_2$ dan P_1M_2 (kontrol); $P_2M_1I_1$, $P_2M_1I_2$ dan P_2M_1 (kontrol); dan $P_2M_2I_1$, $P_2M_2I_2$ dan P_2M_2 (kontrol).

Parasit malaria

Dua spesies parasit malaria yang digunakan adalah *Plasmodium vinckei vinckei* dan *Plasmodium vinckei petteri*, keduanya pemberian dari Prof. F.E.G. Cox, King's College London, University of London, England.

Binatang percobaan

Binatang percobaan yang dipakai adalah mencit BALB/c dan LACA dari jenis *outbreed*, diperoleh dari pengusaha ternak hewan percobaan Tuck & Con, Buttlebridge,

Essex, England. Mencit dipelihara dalam sangkar dari kawat, 5 ekor/sangkar, diberi makan dan minum air secukupnya.

Cara pembuatan vaksin

Vaksin malaria stadium darah dibuat dengan cara seperti yang diuraikan oleh Playfair *et al.* (1979). Darah dikumpulkan dari mencit yang terinfeksi dengan parasitemia antara 40%-60% dan ditampung dalam tabung yang mengandung heparin. Eritrosit dicuci dengan PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7.4, kemudian eritrosit dilisiskan dengan menambahkan larutan saponin 0,01% sebanyak 40 kali volume eritrosit, dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Larutan parasit yang dihasilkan dipusing dengan kecepatan 15000 selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet dilarutkan kembali dalam PBS dan dipusing dengan kecepatan 150 g selama 10 menit. Bagian atas dari pelet yang berwarna kecoklatan karena mengandung parasit diambil dan difiksasi dengan larutan formalin 0,6% dalam PBS selama 5 menit pada suhu kamar. Parasit kemudian dicuci dengan PBS 2 kali, dilarutkan kembali dengan PBS dengan konsentrasi 5×10^8 parasit/ml, dan dibuat alikotot 1 ml/tabung; selanjutnya disimpan dalam nitrogen cair sampai digunakan.

Cara imunisasi

Cara imunisasi yang diuji efektivitasnya dalam penelitian ini adalah imunisasi dengan penyuntikan vaksin yang mengandung 10^8 parasit secara intravenosa dan penyuntikan vaksin serupa yang dikombinasi dengan Freund Complete Adjuvant (FCA) ke dalam ruang peritoneum mencit.

Cara infeksi

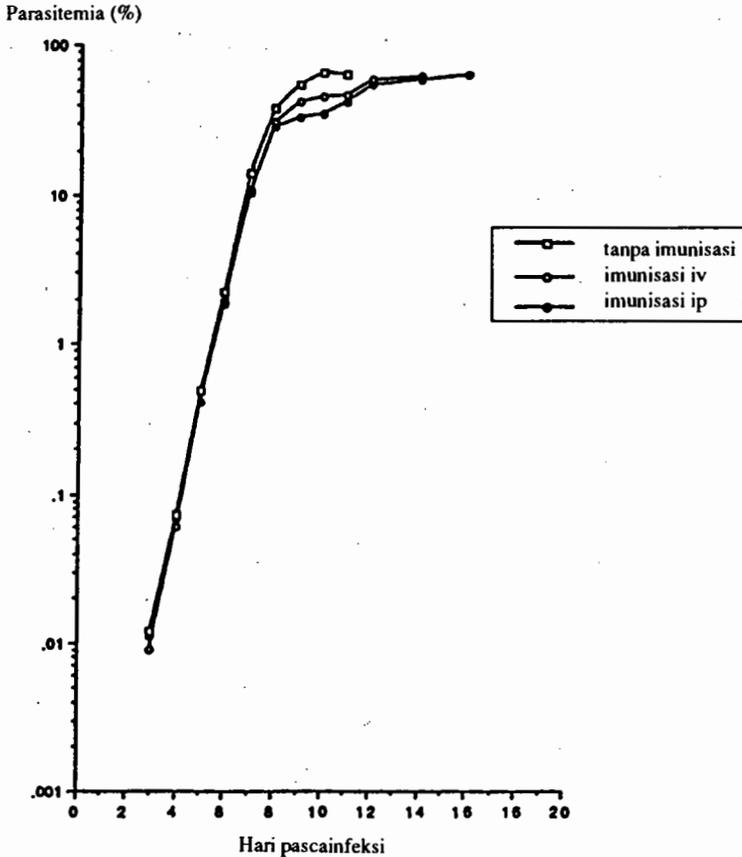
Untuk memudahkan teknis pelaksanaan, penelitian dilakukan dalam 4 tahap. Tahap pertama dengan menggunakan 3 kelompok mencit BALB/c, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor. Kelompok pertama diimunisasi secara intravenosa dengan vaksin *P. v. vinckei*, kelompok kedua dengan vaksin serupa secara intraperitoneal, dan kelompok ketiga tidak diimunisasi (sebagai kelompok kontrol). Pada hari ke 15 sesudah imunisasi, mencit diinfeksi dengan 10^3 eritrosit terinfeksi *P. v. vinckei*. Pada penelitian tahap kedua dilakukan pada mencit LACA dengan imunisasi dan infeksi seperti pada tahap pertama. Penelitian tahap ketiga dilakukan seperti tahap pertama dan penelitian tahap keempat seperti tahap kedua, tetapi dengan infeksi dan vaksin dari *P. v. petteri*. Jalannya infeksi dimonitor setiap hari dengan pemeriksaan sediaan darah yang diambil dari ujung ekor.

HASIL

Infeksi *P. v. vinckei* pada mencit BALB/c

Profil parasitemia dari BALB/c yang diinfeksi dengan *P. v. vinckei* disajikan pada GAMBAR 1. Ternyata model infeksi ini bersifat akut dan fatal. Parasitemia naik dengan cepat dan semua mencit yang diinfeksi mati pada hari ke 10-11 sesudah infeksi. Kedua cara imunisasi yang diberikan tidak berhasil mencegah mencit dari kematian. Parasit

mulai terdeteksi di dalam darah pada hari ketiga. Dari stadium awal sampai hari ke 8 gambaran parasitemia mencit dari kelompok yang diimunisasi sama dengan kelompok kontrol. Parasitemia pada kelompok kontrol kemudian terus naik, dan 2 mencit mati pada hari ke-10 dengan parasitemia sekitar 65% dan 3 mencit mati pada hari ke-11 dengan parasitemia sekitar 64%. Pada kelompok yang diimunisasi secara intravenosa penekanan parasitemia terlihat antara hari ke 9-11 bersamaan dengan munculnya *crisis form* (parasit yang mati/mengalami degenerasi). Pada saat itu parasitemia tidak lebih dari 46%, tetapi kemudian naik lagi sampai 59% pada hari ke 12 disertai menghilangnya *crisis form* dari darah tepi. Semua mencit dari kelompok ini mati pada hari ke 14 dengan parasitemia sekitar 62%. Penurunan parasitemia juga terlihat pada mencit yang diimunisasi secara intraperitoneal disertai munculnya *crisis form* yang cepat dan 2 mencit mati pada hari ke 14 dan 3 mencit lainnya pada hari ke 16 dengan parasitemia sekitar 64%.



GAMBAR 1 - Profil parasitemia dari mencit BALB/c yang diinfeksi dengan malaria *P.v.vinckeii*. Tiga kelompok mencit masing-masing terdiri atas 5 ekor: mencit normal, yang telah diimunisasi secara intravena, dan yang telah diimunisasi secara intraperitoneal, diinfeksi dengan 1×10^3 eritrosit yang mengandung parasit pada hari ke 15 sesudah imunisasi. Parasitemia dari tiap-tiap mencit dimonitor setiap hari dengan pemeriksaan sediaan darah yang diambil dari ujung ekor. Tiap-tiap titik merupakan nilai rerata dari persentase eritrosit yang terinfeksi.

Infeksi *P. v. vinckei* pada mencit LACA

Profil parasitemia mencit LACA yang diinfeksi *P. v. vinckei* seperti terlihat pada GAMBAR 2. Model infeksi ini juga bersifat akut dan fatal, mencit mati pada hari ke 11 dengan parasitemia sekitar 67%. Penekanan kenaikan parasitemia pada kelompok mencit yang diimunisasi secara intravenosa terlihat antara hari ke 9-11. Parasitemia pada 4 mencit dari kelompok ini kemudian naik dengan cepat, 3 mencit mati pada hari ke 14 dan 1 mencit pada hari ke 16 dengan parasitemia sekitar 65%. Parasitemia pada 1 mencit dari kelompok ini menurun sampai kurang dari 0,015 pada hari ke-20 dan parasit tak terdeteksi lagi dalam darah tepi pada hari ke-22. Bentuk degeneratif dan *crisis form* terlihat mulai hari ke-9 kemudian semakin banyak dan tetap terlihat sampai parasit menghilang dari darah tepi. Pada kelompok mencit yang diimunisasi secara intraperitoneal penghambatan kenaikan parasitemia terlihat antara hari ke 8-12, kemudian naik kembali, dan semua mencit dari kelompok ini mati pada hari ke-14 dengan parasitemia sekitar 63%. Bentuk-bentuk degeneratif dan *crisis form* juga terlihat pada saat penurunan parasitemia tetapi dengan cepat menghilang.

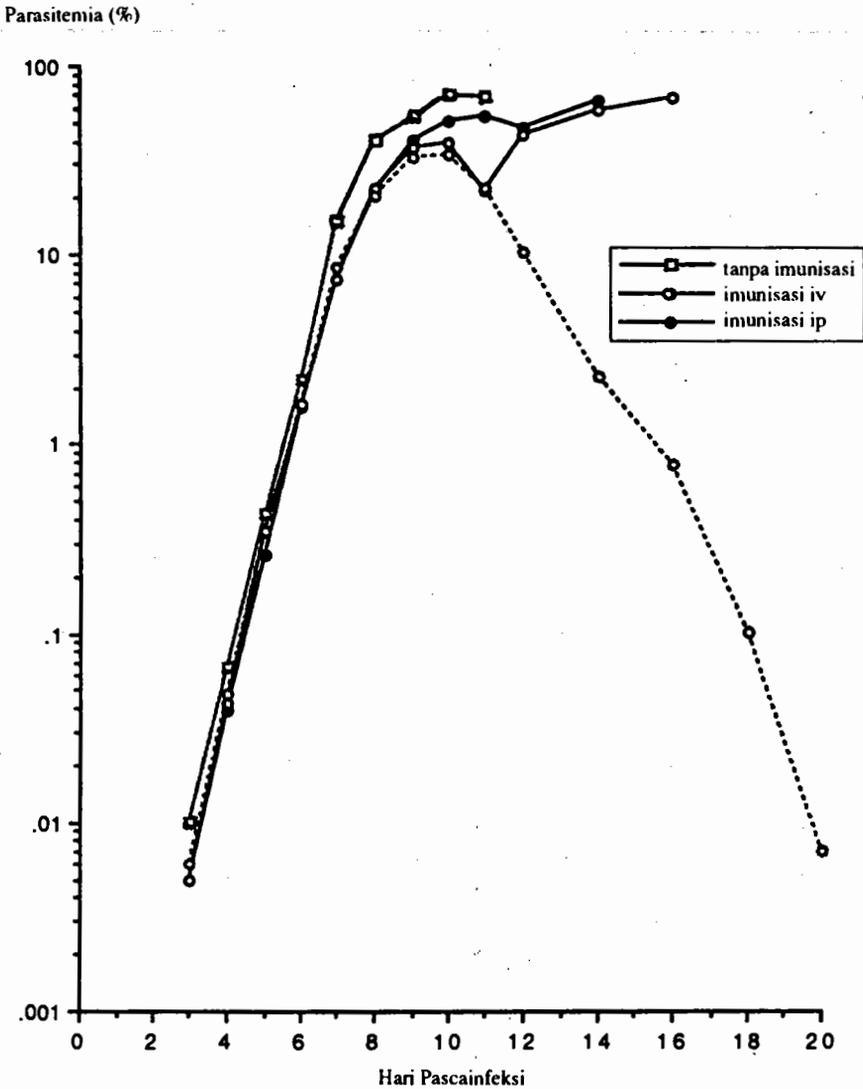
Infeksi *P. v. petteri* pada mencit BALB/c

Seperti terlihat pada GAMBAR 3, parasitemia dari semua kelompok mencit naik dengan cepat sampai hari ke 7. Pada kelompok kontrol parasitemia dari 4 mencit terus naik sampai mencapai sekitar 70% dan keempatnya mati pada hari ke 11, sedangkan pada satu mencit lainnya kenaikan parasitemia melambat pada hari-hari berikutnya, yaitu mencapai sekitar 22-41%, kemudian menurun dengan cepat. *Crisis form* dan bentuk degeneratif pada mencit ini mulai muncul pada hari ke 9, dan menjadi banyak pada saat parasitemia menurun cepat. Parasit pada mencit ini kemudian menghilang dengan sempurna pada hari ke 22 sesudah infeksi. Pada kedua kelompok mencit yang diimunisasi kenaikan parasitemia melambat pada hari ke 8-10. Parasitemia dari 1 mencit pada masing-masing kelompok kemudian menurun cepat disertai dengan semakin banyaknya bentuk-bentuk degeneratif. Kedua mencit tersebut kemudian bebas dari parasit pada hari ke 18 sesudah infeksi. Sedangkan parasitemia keempat mencit dari masing-masing kelompok yang diimunisasi naik lagi, 2 mencit dari kelompok imunisasi intravenosa mati pada hari ke 12 dengan parasitemia sekitar 65% dan 2 mencit yang lain mati pada hari ke 14 dengan parasitemia sekitar 67%. Keempat mencit dari kelompok imunisasi intraperitoneal mati pada hari ke 14 dengan parasitemia sekitar 66%. Pada pemeriksaan sediaan darah nampak bahwa sel-sel leukosit meningkat terutama pada saat parasitemia tinggi, dan beberapa monosit dan granulosit mengandung pigmen malaria.

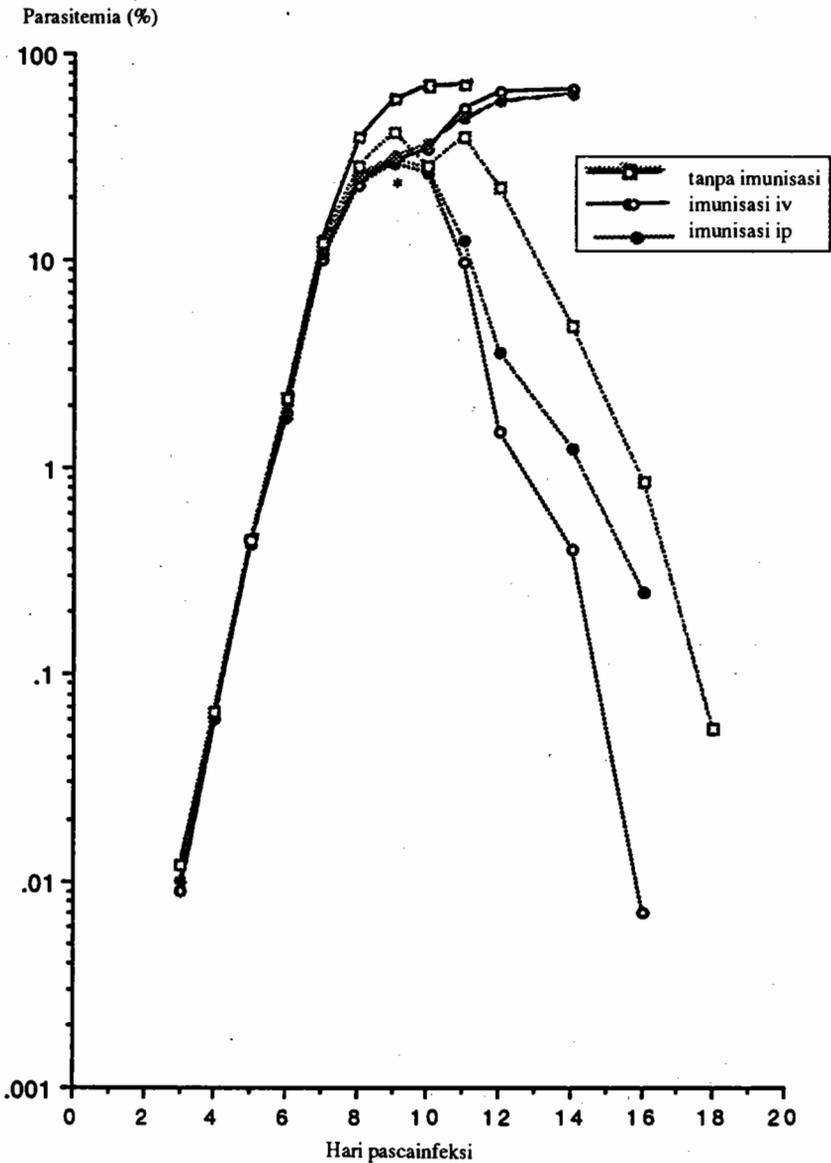
Infeksi *P. v. petteri* pada mencit LACA

Seperti terlihat pada GAMBAR 4, model infeksi ini merupakan infeksi malaria yang akut dan letal, mencit biasanya mati pada hari 11-12 dengan parasitemia sekitar 73%. Pada kelompok mencit yang diimunisasi parasitemia juga meningkat dengan cepat pada stadium awal, kemudian melambat, mencapai puncaknya pada hari ke 10 sekitar 34% pada mencit yang diimunisasi secara intravenosa. Parasitemia kemudian menurun secara cepat dan parasit menghilang dari darah tepi pada hari ke 18 sesudah infeksi. Pada kelompok mencit yang diimunisasi secara intraperitoneal parasitemia naik sampai sekitar

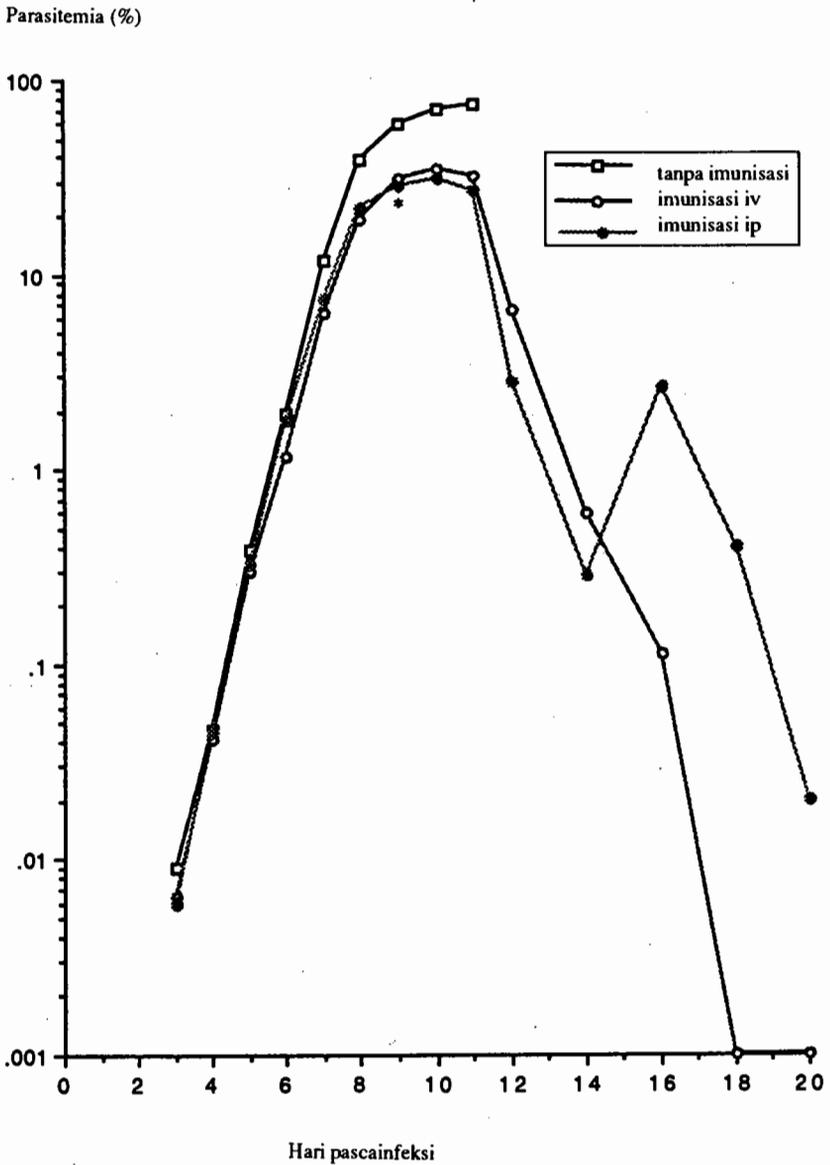
30% pada hari ke 10, kemudian menurun cepat sampai 0.3% pada hari ke 14, naik lagi sampai 3% pada hari ke 16, dan turun kembali sampai tak terdeteksi dari darah tepi.



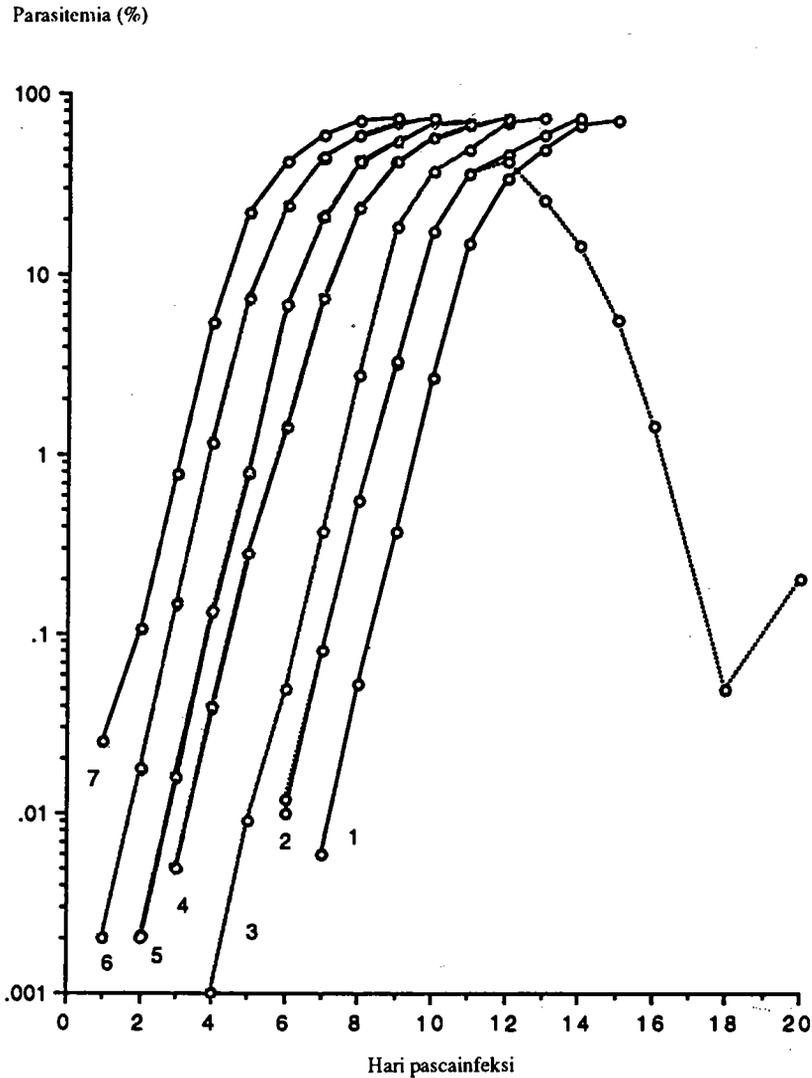
GAMBAR 2 - Profil parasitemia dari mencit LACA yang diinfeksi dengan malaria *P.v.vinckei*. Tiga kelompok mencit masing-masing terdiri atas 5 ekor: mencit normal, yang telah diimunisasi secara intravena, dan yang telah diimunisasi secara intraperitoneal, diinfeksi dengan 1×10^3 eritrosit yang mengandung parasit pada hari ke 15 sesudah imunisasi. Parasitemia dari tiap-tiap mencit dimonitor setiap hari dengan pemeriksaan sediaan darah yang dibuat dari ujung ekor. Tiap titik merupakan nilai rerata dari persentase eritrosit yang terinfeksi.



GAMBAR 3 - Profil parasitemia dari mencit BALB/c yang diinfeksi dengan malaria *P.v.petteri*. Tiga kelompok mencit masing-masing terdiri atas 5 ekor: mencit normal, yang telah diimunisasi secara intravena, dan yang telah diimunisasi secara intraperitoneal, diinfeksi dengan 1×10^3 eritrosit yang mengandung parasit pada hari ke 15 sesudah imunisasi. Parasitemia dari tiap-tiap mencit dimonitor setiap hari dengan pemeriksaan sedian darah yang diambil dari ujung ekor. Tiap-tiap titik merupakan nilai rerata dari persentase eritrosit yang terinfeksi. Garis terputus-putus menggambarkan parasitemia 4 mencit yang mati, dan garis dengan titik-titik adalah parasitemia dari mencit yang sembuh dari infeksi.



GAMBAR 4 – Profil parasitemia dari mencit LACA yang diinfeksi dengan malaria *P.v.petteri*. Tiga kelompok mencit masing-masing terdiri atas 5 ekor: mencit normal, yang telah diimunisasi secara intra vena, dan yang telah diimunisasi secara intra peritoneal, diinfeksi dengan 1×10^3 eritrosit yang mengandung parasit pada hari ke 15 sesudah imunisasi. Parasitemia dari tiap-tiap mencit dimonitor setiap hari dengan pemeriksaan sediaan darah yang dibuat dari ujung ekor. Tiap-tiap titik merupakan nilai rerata dari persentase eritrosit yang terinfeksi.



GAMBAR 5 - Karakteristik dari parasitemia mencit LACA yang diinfeksi dengan *P.v.petteri*. Tujuh kelompok mencit LACA, masing-masing terdiri atas 3 ekor, kelompok 1-7 berturut-turut disuntik dengan $1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ dan 10^6 eritrosit yang mengandung parasit pada hari ke 0. Parasitemia masing-masing mencit diamati setiap hari dengan pemeriksaan darah yang dibuat dari ujung ekor. Tiap-tiap titik merupakan nilai rerata parasitemia dari 3 mencit, kecuali kelompok 2 dari 2 mencit. Garis bertitik-titik pada kelompok 2 merupakan parasitemia dari 1 mencit yang sembuh dari infeksi.

Pengamatan selama infeksi menunjukkan bahwa pada stadium awal tidak terlihat adanya tanda-tanda klinis baik pada mencit yang diimunisasi maupun yang tidak. Sekitar hari ke 8 mencit mulai tampak kurang aktif, kedinginan, menggigil dan tampak sangat lemah, oligouria dan urin berwarna gelap. Pada kelompok mencit yang diimunisasi gejala-gejala ini tampak lebih berat, tetapi dengan cepat menghilang dan disusul dengan penyembuhan. Gambaran darah tepi pada waktu penyembuhan didominasi oleh bentuk-bentuk degeneratif dan *crisis form*, kemudian diganti dengan populasi retikulosit dan bentuk-bentuk eritrosit muda. Sel leukosit nampak lebih banyak dan beberapa sel mengandung pigmen malaria.

Karakteristik infeksi *P. v. petteri* pada mencit LACA

Dari hasil di atas tampak bahwa kombinasi model infeksi dan imunisasi keempat yang bersifat paling protektif, dalam arti mampu menurunkan parasitemia dan melindungi kematian dari infeksi malaria yang biasanya fatal. Dengan demikian model ini merupakan model infeksi dan imunisasi yang baik untuk mempelajari berbagai reaksi imun yang terjadi selama imunisasi. Gambaran umum dari infeksi *P. v. petteri* pada mencit LACA kemudian dipelajari lebih lanjut dengan menginfeksi mencit dengan 1, 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 dan 10^6 eritrosit terinfeksi, secara intravenosa. Karakteristik parasitemia terlihat pada GAMBAR 5.

Morfologi

Gambaran mikroskopis dari sediaan darah mencit yang diinfeksi *P. v. petteri* menunjukkan bahwa pada medan penglihatan didominasi oleh bentuk trofosit yang menempati 2/3 ruangan di dalam eritrosit. Parasit ini kadang-kadang mengandung vakuola yang berisi pigmen berwarna coklat mengkilat. Sel yang terinfeksi dindingnya tampak tidak teratur terutama setelah parasit menjadi bentuk trofosit tua, dan banyak di antaranya yang berbentuk bintang. Bentuk schizon tua berisi 7-12 merozoit, dan *P. v. petteri* pada umumnya menginfeksi eritrosit yang tua. Profil parasitemia karakteristik untuk infeksi akut, dan periode prepatennya tergantung pada jumlah parasit yang diinfeksi. Pada infeksi dengan satu parasit diperlukan sekitar 7 hari untuk bisa dideteksi dalam darah tepi, sedangkan infeksi dengan 10^5 parasit periode prepatennya hanya 1 hari.

PEMBAHASAN

Pada model-model infeksi malaria ini tampak bahwa baik *P. v. vinckei* maupun *P. v. petteri* mempunyai infektifitas yang serupa. Baik pada mencit BALB/c maupun LACA, ditandai dengan miripnya periode prepaten pada infeksi yang sama. Di lain pihak, baik mencit BALB/c maupun LACA keduanya memperlihatkan kemampuan mengaktifkan reaksi imun seluler yang tidak spesifik, walaupun mungkin dalam kualitas maupun kuantitas yang tidak sama. Infeksi *P. v. vinckei* pada mencit BALB/c maupun LACA nampak lebih virulen dibandingkan dengan *P. v. petteri*. Mencit yang diinfeksi dengan 10^3 parasit hanya mampu hidup selama 10-11 hari. Kedua cara imunisasi yang diberikan tidak dapat mencegah mencit dari kematian, dan hanya menundanya selama 2-5 hari. Hal ini mungkin disebabkan karena imunogen yang diberikan tidak berhasil memacu reaksi

imun seluler yang protektif, sedangkan pada model infeksi lain jelas merupakan mekanisme kekebalan yang utama selama infeksi *P. v. vinckei* (Kumar *et al.*, 1989; Cox & Millot, 1984; Cavacini *et al.*, 1990).

Penelitian serupa dilakukan oleh Kumar *et al.* (1989) dengan menggunakan vaksin yang dicampur dengan berbagai macam adjuvan termasuk *Bordetella pertusis*, saponin dan FCA. Dilaporkan bahwa cara-cara imunisasi tersebut tidak ada yang berhasil melindungi mencit terhadap infeksi parasit yang homolog. Namun pada penelitiannya lebih lanjut ditunjukkan bahwa imunitas bisa ditimbulkan dengan imunisasi menggunakan parasit stadium darah yang dikombinasi dengan *Salmonella typhimurium* (oro A) yang telah dilemahkan (Kumar *et al.*, 1990). Lebih lanjut ditunjukkan bahwa imunitas mencit yang dibuat dengan cara tersebut dapat hilang apabila $CD4^+$ T cell (Limfosit T helper) dihilangkan secara *in vivo*. Bahkan lebih lanjut ditunjukkan bahwa imunitas tersebut tidak bisa ditimbulkan apabila mencit diambil limpanya sebelum diimunisasi.

Dalam penelitian ini profil parasitemia pada stadium awal baik pada kelompok mencit yang diimunisasi maupun yang tidak adalah serupa. Begitu infeksi terjadi parasit berkembang dengan cepat mendekati *expected parasitemia* yaitu bertambah dengan kelipatan 8 setiap 24 jam (Cox & Millot, 1984). Hal ini menunjukkan bahwa pada saat tersebut pertumbuhan dan multiplikasi parasit belum dipengaruhi oleh mekanisme-mekanisme imun yang bersifat alami maupun yang didapat. Cox dan Millot (1984) menduga bahwa mekanisme efektor sistem kekebalan tubuh hospes mungkin tidak terstimulasi sampai derajat parasitemia mencapai nilai ambang tertentu. Kemungkinan lain adalah berkaitan dengan kadar molekul-molekul pembunuh parasit di dalam darah ataupun dalam limpa yang belum cukup tinggi pada tahap awal dari infeksi. Hal ini dengan sendirinya dipengaruhi pula oleh jumlah sel pembuat molekul tersebut, serta intensitas rangsangan yang mestinya berasal dari parasit yang menginfeksi.

KESIMPULAN

Infeksi *P. v. petteri* pada mencit BALB/c juga bersifat akut tetapi kurang virulen dibandingkan dengan *P. v. vinckei*, dan imunisasi secara intraperitoneal memberi proteksi yang tidak sempurna, sedangkan imunisasi secara intravena tidak protektif sama sekali. Imunisasi serupa pada mencit LACA pada umumnya bersifat protektif terhadap infeksi parasit homolog *P. v. petteri*. Dengan model ini semua mencit dari kelompok yang diimunisasi sembuh sempurna setelah mengalami parasitemia sekitar 30%. Banyaknya bentuk degeneratif dan *crisis form* dan meningkatnya jumlah leukosit pada stadium penyembuhan menunjukkan adanya stimulasi kuat terhadap imunitas seluler yang mungkin bertanggung jawab atas proses penyembuhan tersebut. Dengan demikian model infeksi *P. v. petteri* pada mencit LACA dan cara imunisasi dengan parasit stadium darah yang diberikan secara intravena ataupun intraperitoneal merupakan model yang baik untuk dapat mempelajari mekanisme kekebalan tubuh selama infeksi dan selama imunisasi.

KEPUSTAKAAN

- Anders, R. F., & Brown, G. V. 1990 Vaccine against asexual blood stage of *Plasmodium falciparum*. *Progress in Allergy* 41:492-512.

- Cavacini, L. A., Parke, L. A., & Weidanz, W. P. 1990 Resolution of acute malarial infection by T cell-dependent non-antibody-mediated mechanism of immunity. *Infect. Immun.* 58:2946-52.
- Collins, W. E., Anders, R. F., Pappaioanou, M., Campbell, G. H., & Brown, G. V. 1986 Immunization of Aotus monkey with recombinant protein of an erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 232:259-62.
- Cox, F. E. G., & Millot, S. M. 1984 The importance of parasite load in the killing of *Plasmodium vinckei* in mice treated with *Corynebacterium parvum* or aloxan monohydrate. *Parasitology* 89:417-22.
- Dame, J. B., Williams, J. L., McCutchan, T. F., Weber, J. L., Wirtz, R. A., Hockmeyer, W. T., Maloy, W. L., Haynes, J. C. Robert, I. S. D. 1985 Surface antigen of the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 225:593-9.
- Herrington, D. A., Clyde, D. F., Losonsky, G. 1987 Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* 382:257-62.
- Holder, A. H. 1988 The precursor to major merozoite surface antigens: Structure and role in immunity. *Progr. in Allergy* 41:72-97.
- Kumar, S., Good, M. F., Dontfraid, F., Vinetz, J. M., & Miller, L. H. 1989 Interdependent of CD4⁺ T cells and malaria spleen in immunity to *Plasmodium vinckei vinckei*. *Immunology* 143:2017-2022.
- Kumar, S., Gordon, J., Flynn, J. L., Berzofsky, J. A., & Miller, L. H. 1990 Immunization of mice against *Plasmodium vinckei* with a combination of attenuated *Salmonella typhimurium* and malarial antigen. *Infect. Immunol.* 58:3425.
- Patarroyo, G., Franco, L., Amador, R., Romero, P., & Clavijo, P. 1992 Study of the safety and immunogenicity of the synthetic malaria SPf66 vaccine in children aged 1-14 years. *Vaccine* 10:175-8.
- Playfair, J. H. L., de Souza, J. B., Dockrell, H. M., Agomo P. U., & Taverne, J. 1979 Cell mediated immunity in the liver of mice vaccinated against malaria. *Nature* 282:731.
- Robinson, T. A. W. and Phillips, R. S. 1992 Functional characterization of protective CD4⁺T cell clone reactive to the murine malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Immunology.* 77:99.
- Sina, B. J., Wright, C., Ballou, R., & Hollingdale, M. 1992 A protective monoclonal antibody with dual specificity for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* circumsporozoite proteins. *Exper. Parasitol.* 74:431-40.
- Schofield, L., Villaquiran, J., Ferreira, A., Scheilekens, H., Nussenzeig, R. S., & Nussenzeig, V. 1987 Interferon, CD8⁺T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 330:664.
- Waki, S., Uehara, S., Kanbe, K., Ono, K., Suzuki, M., & Nariuchi, H. 1992 The role of T cells in pathogenesis and protective immunity to murine malaria. *Immunology.* 75:646.
- Weidanz, W. P. 1982 Malaria and alterations in immune reactivity. *Br. Med. Bull.* 38:167.
- Weiss, W. R., Sedegah, M., Beaudoin, R. I. Miller, L. H., & Good, M. F., 1988 CD8⁺T cells (cytotoxic/suppressor) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Pros. Nat. Ac. Sci.* 85:573-7.
- Wozencraft, A.O., Croft, S.L., & Sayers, G. 1985 Oxygen radical release by adherent cell populations during the initial stages of a lethal rodent malarial infection. *Immunology.* 56:532-27.
-