

Pencirian Jangkitan *Plasmodium berghei* NK65 pada Mencit ICR sebagai Model Jangkitan Malaria Teruk

(Characterisation of *Plasmodium berghei* NK65 Infection in ICR Mice as a Severe Malarial Infection Model)

AMATUL HAMIZAH ALI¹, WAN ROZIANOOR MOHD HASSAN², DHIANA EFANI DAHARI³, NOOR EMBI³, HASIDAH MOHD SIDEK³, RUSLIZA BASIR⁴, HANI KARTINI AGUSTAR⁵ & JALIFAH LATIP^{1,*}

¹Jabatan Sains Kimia, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

²Fakulti Sains Gunaan, Universiti Teknologi MARA, 40450 Shah Alam, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

³Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

⁴Unit Farmakologi, Jabatan Anatomi Manusia, Fakulti Perubatan dan Sains Kesihatan, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

⁵Jabatan Sains Bumi dan Alam Sekitar, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

Diserahkan: 13 Mac 2022/Diterima: 4 Julai 2022

ABSTRAK

Malaria teruk atau 'severe' kebiasaannya disebabkan oleh jangkitan *Plasmodium falciparum*. Jangkitan *Plasmodium falciparum* pada manusia boleh menyebabkan kerosakan organ, anemia teruk, komplikasi serius, koma dan kematian. Bagi tujuan memahami patogenesis malaria teruk, model haiwan digunakan dalam kajian kali ini bagi mengenal pasti sama ada gabungan hos-parasit daripada mencit ICR dengan *Plasmodium berghei* NK65 boleh menyebabkan jangkitan malaria teruk pada hos. Pencirian jangkitan *P. berghei* ANKA pernah dilakukan sebelum ini terhadap mencit ICR; walau bagaimanapun, pencirian jangkitan *P. berghei* NK65 secara terperinci terhadap mencit ICR dalam kajian ini adalah pertama kali dilaporkan. Inokulasi sel darah merah (RBC) terjangkit-*P. berghei* NK65 (2×10^7 parasit RBC (pRBC)/mL) dilakukan terhadap mencit ICR dengan suntikan secara intraperitoneum. Pemantauan perubahan ciri fizikal seperti berat, suhu mencit, kematian mencit, pos mortem, histologi dan aras sitokin inflamasi yang terhasil selepas jangkitan direkod untuk analisis. Strain *P. berghei* NK65 menghasilkan jangkitan tahap teruk terhadap mencit ICR iaitu parasitemia melebihi 50% pada hari ke-10 selepas jangkitan diikuti kematian. Analisis histopatologi menunjukkan jangkitan ini menyebabkan perubahan pada tisu serebrum, perlekatan leukosit pada endotelium dan penskuesteran pRBC dalam salur darah serebrum serta pendarahan intravaskular. Selepas jangkitan, penskuesteran pRBC dan pengumpulan pigmen malaria turut dilihat pada organ utama mencit. Tambahan lagi, edema pulmonari, pembentukan membran hialin pada peparu dan pendarahan kortikal pada ginjal dilihat pada mencit terjangkit. Sitokin proinflamasi (TNF- α , IFN- γ , dan IL-18) dan sitokin antiinflamasi (IL-10 dan IL-4) juga meningkat dalam serum mencit terjangkit. Secara rumusnya, model jangkitan mencit ICR-*P. berghei* NK65 yang digunakan dalam kajian ini menunjukkan ciri-ciri jangkitan malaria teruk. Hasil daripada kajian ini boleh digunakan sebagai asas untuk memahami patogenesis bagi malaria teruk pada manusia dan model jangkitan malaria haiwan pada masa akan datang.

Kata kunci: Histopatologi; malaria; mencit ICR; model jangkitan haiwan; *Plasmodium berghei* NK65; sitokin inflamasi

ABSTRACT

Severe malaria is commonly caused by *Plasmodium falciparum* infection. *Plasmodium falciparum* infection in human can cause organ damage, severe anaemia, serious complications, coma and death. For the purpose of understanding the pathogenesis of severe malaria, an animal model was used in this study to examine whether the combination of host-parasite from ICR mice with *Plasmodium berghei* NK65 caused severe malaria infection in the host. Characterisation

of *P. berghei* ANKA infection has been performed previously on ICR mice, however, the detailed histopathological view of *P. berghei* NK65 infection on ICR mice in this study was first reported. Inoculation of the *P. berghei* NK65-infected red blood cells (RBCs) (2×10^7 parasitised RBCs (pRBC)/mL) were performed on ICR mice by intraperitoneal injection. Changes in physical characteristics such as body weight, temperature, mortality, post-mortem, histopathology and levels of inflammatory cytokines resulting after infection were recorded for analysis. The *P. berghei* NK65 strain produced a severe level of infection in ICR mice i.e., the degree of parasitaemia exceeded 50% on day-10 after infection followed by death. Histopathological analysis showed that the infection caused changes in cerebral tissue, accumulation of leukocytes to the endothelium and sequestration of pRBCs in the cerebral blood vessels as well as intravascular haemorrhage. After infection, pRBC sequestration and accumulation of malaria pigments were also observed in the major organs. In addition, pulmonary oedema, hyaline membrane formation in the lungs and cortical haemorrhage in the kidneys were seen in infected mice. Proinflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , and IL-18) and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-4) were also increased in the serum of infected mice. In summary, the ICR mice-*P. berghei* NK65 infection model used in this study showed characteristics of severe malaria infection in human. The insights from this study can be used as a basis for understanding the pathogenesis of severe malaria in human and models of rodent malarial infection in the future.

Keywords: Animal infection model; histopathology; ICR mice; inflammatory cytokines; malaria; *Plasmodium berghei* NK65

PENGENALAN

Malaria merupakan penyakit yang mengancam nyawa yang disebabkan oleh jangkitan parasit *Plasmodium* sp. melalui vektor nyamuk *Anopheles* sp. Ancaman besar penyakit malaria kepada kesihatan manusia telah menyebabkan 241 juta kes klinikal dan 627,000 kematian berlaku pada tahun 2020 di seluruh dunia (WHO 2021). Majoriti kematian berkaitan malaria adalah disebabkan oleh jangkitan *Plasmodium falciparum* yang menyebabkan komplikasi yang teruk, gangguan pelbagai sistem tubuh yang kompleks, pelbagai ciri klinikal dan kematian terutama di kawasan tropika (Amal et al. 2006; Nimir et al. 2006). Malaysia juga mempunyai jangkitan *P. falciparum* di kawasan pedalaman Sabah dan Sarawak; walau bagaimanapun, jangkitan malaria paling banyak di Malaysia adalah disebabkan oleh *P. knowlesi* (Dian et al. 2021; Lai et al. 2021; Rahim et al. 2020).

Jangkitan malaria teruk atau 'severe malaria' digambarkan sebagai dua sindrom utama iaitu anemia teruk dan malaria serebrum (Mackintosh et al. 2004). Individu yang mengalami malaria teruk boleh menunjukkan salah satu sindrom atau keduanya sekali. Anemia yang teruk adalah sindrom yang melibatkan ciri klinikal seperti demam panas mengejut, pengsan dan gangguan pernafasan yang disebabkan oleh kekurangan sel darah merah (RBC) melalui pengurangan aktiviti eritropoietin, peningkatan pelepasan sitokin proinflamasi dan peningkatan kemusnahan RBC akibat parasit, eritrofagositosis, antibodi dan lisis (Menendez et

al. 2000; Sexton et al. 2004; Stoute et al. 2003). Untuk sindrom malaria serebrum, sekatan mikrovaskular, peningkatan sitokin proinflamasi dan toksin parasit (contohnya glikosilfosfatidilinositol) yang berlaku pada organ otak menyumbang kepada komplikasi serebrum; contohnya pengsan, sawan, koma dan defisit neurologi jangka panjang (Sexton et al. 2004; Stoute et al. 2003). Dalam malaria teruk, kedua-dua anemia dan malaria serebrum melibatkan proses pengisyaratan imunopatogen dengan sitokin proinflamasi yang membawa kepada perubahan metabolik hiliran yang kompleks (Mackintosh et al. 2004). Aruhan penghasilan sitokin proinflamasi seperti tumor nekrosis faktor-alfa (TNF- α) oleh makrofaj akibat pemecahan skizon parasit merupakan kejadian awal dalam patologi malaria (Perkins et al. 2011). Malaria serebrum bukan sahaja disebabkan oleh sekuela neurologi dalam otak, tetapi juga tahap sitokin proinflamasi yang tinggi akibat tindak balas imun yang terlalu aktif terhadap jangkitan (Angulo & Fresno 2002). Justeru, peningkatan aras sitokin proinflamasi adalah salah satu faktor keterukan dalam jangkitan malaria.

Model haiwan uji kaji adalah langkah penting dalam kajian patogenesis penyakit dan perkembangan terapeutik dalam malaria (Aizuddin et al. 2020; Druilhe et al. 2002). Haiwan digunakan sebagai model penyakit bagi manusia disebabkan oleh beberapa prosedur penyelidikan yang mustahil untuk dijalankan pada manusia atas sebab praktikal atau etika. Dalam jangkitan malaria, interaksi antara sistem imun hos dan kitar hidup parasit yang berbeza telah kerap dikaji menggunakan

model tikus sebagai perumah (Li et al. 2001). Walaupun model tikus bukanlah replikasi tepat jangkitan dan penyakit manusia, tetapi ia memberikan banyak maklumat berguna tentang interaksi sistem imun hos dan parasit malaria (Li et al. 2001), serta perubahan patologi yang hampir tepat dan berguna untuk menganalisis neuropatologi (De Souza & Riley 2002). Pelbagai faktor atau gabungan perumah dan parasit bertanggungjawab ke atas kesan patologi yang berbeza dalam patogenesis malaria. Dalam kajian model haiwan, gabungan perumah-parasit yang berbeza telah merungkai persoalan mekanisme molekul yang terlibat dalam patologi malaria teruk (Druilhe et al. 2002).

Virulensi jangkitan boleh berbeza bergantung pada strain *Plasmodium* dan strain mencit. Sesetengah jangkitan strain parasit boleh membawa maut kepada strain mencit yang tertentu sahaja (contohnya *Plasmodium chabaudi*) dan sesetengahnya boleh membawa maut kepada semua strain mencit (contohnya *Plasmodium berghei*). *P. berghei* NK65 merupakan parasit peringkat kitar hidup eritrosit yang boleh membawa maut dan suatu strain jangkitan malaria yang sangat virulen pada mencit, serta mewakili model yang paling sesuai untuk mengkaji malaria teruk (Craig et al. 2012). Kajian lepas oleh Yoshimoto et al. (1998) mendapati bahawa *P. berghei* NK65 ialah strain parasit yang tidak menyebabkan malaria serebrum pada mencit C57BL/6 dan tiada petunjuk asas neurologi malaria serebrum seperti ataksia, lumpuh, sawan dan koma ditemui semasa jangkitan (Bagot et al. 2002). Walau bagaimanapun, Lacerda-Queiroz et al. (2011) melaporkan bahawa *P. berghei* NK65 dapat menyebabkan keradangan dalam mikrovaskular serebrum dalam mencit C57BL/6 dan BALB/c. Selain itu, jangkitan *P. berghei* strain ANKA pada mencit ICR (Basir et al. 2012) boleh mengakibatkan imunopatogenesis yang berbeza-beza berbanding jangkitan menggunakan strain parasit yang sama dalam tikus C57BL/6J (Druilhe et al. 2002). Walau bagaimanapun, jangkitan *P. berghei* NK65 terhadap mencit ICR yang melibatkan ujian histologi dan analisis sitokin belum lagi pernah dilaporkan secara terperinci. Kajian ini bertujuan untuk memahami patogenesis malaria teruk menggunakan gabungan perumah-parasit, mencit ICR-*P. berghei* NK65. Pengenal model malaria dalam kajian ini dapat memberi kefahaman mengenai ciri-ciri patofisiologi dalam *in vivo* dan proses asas yang membawa kepada maklumat manifestasi teruk dan kematian dalam kes malaria pada manusia.

BAHAN DAN KAEDAH

HAIWAN KAJIAN

Mencit ICR jantan (25 ± 5 g; berumur 6-8 minggu) diperoleh dan ditempatkan di Kompleks Rumah Haiwan, Universiti Kebangsaan Malaysia. Haiwan itu dikekalkan pada suhu bilik (25 hingga 27 °C), pada kitaran cahaya 12 jam (0800-2000) dan gelap (2000-0800) dengan bekalan pelet makanan dan air secara *ad libitum*. Kelulusan untuk menjalankan kajian haiwan diperoleh daripada Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMAEC) (Nombor rujukan: FST/2014/HASIDAH/20-MAR./581-MAR.-2014-NOV.-2015).

INOKULASI PARASIT

Parasit malaria mencit, strain *P. berghei* NK65 (sensitif-klorokuin), diperoleh daripada BEI Resources, Amerika Syarikat. Penyimpanan stok *P. berghei* dilakukan dengan kaedah krio dan jangkitan dalam mencit ICR yang sihat. Pada hari inokulasi, parasitemia diukur dalam darah ekor mencit yang terjangkit. Setelah parasitemia mencapai 50%, darah dikeluarkan daripada mencit yang dijangkiti melalui tusukan jantung atau 'cardiac puncture' selepas dimatikan melalui pemberian gas karbon dioksida. Sebanyak 2×10^7 pRBC dalam 0.2 mL 0.85% salin disediakan dan disuntik ke dalam kumpulan mencit kajian ($n = 8$) secara intraperitonium. Kumpulan mencit kawalan ($n = 8$) menerima jumlah isi padu suntikan yang setara menggunakan sel darah merah normal yang tidak dijangkiti.

PENGUKURAN PARAMETER FIZIKAL DAN PARASITEMIA

Pengukuran parameter fizikal melibatkan berat badan, suhu, perubahan ciri fizikal dan kemandirian mencit. Berat badan mencit diukur sepanjang kajian menggunakan penimbang A&D (FXI-12). Suhu aksilari mencit diukur menggunakan termometer badan OMRON (MC246). Semua mencit jangkitan dan kawalan dipantau bagi sebarang perubahan tingkah laku dan tanda-tanda penyakit termasuk cirit-birit, kelesuan, piloereksi dan pengurangan aktiviti lokomotor. Berdasarkan skala arbitrari, sebarang simptom penyakit dihitung dan direkodkan sebagai tiada simptom (-), ringan (+), sederhana (++) atau teruk (+++). Kematian mencit direkodkan sepanjang uji kaji. Parasitemia darah pula diukur menggunakan teknik calitan slaid darah daripada ekor. Setitik darah diperoleh melalui pematangan sedikit

hujung ekor mencit dan diletakkan di atas slaid mikroskop (ketebalan 76×26 mm). Lapisan nipis darah dibiarkan kering pada suhu bilik sebelum diwarnakan dengan pewarnaan 'field stain' A (metilena biru) dan B (eosin). Slaid darah dilihat menggunakan mikroskop cahaya (Leica, Jerman) dengan minyak imersi (pembesaran $1000\times$). Tahap parasitemia darah ditentukan berdasarkan bilangan sel darah merah yang terjangkit parasit dalam 1000 jumlah sel darah merah (jumlah dijangkiti dan tidak dijangkiti). Nilai parasitemia seterusnya ditukar kepada bentuk peratus. Bacaan diambil sebanyak tiga kali dan dianalisis (Basir et al. 2012).

ANALISIS SITOKIN SERUM

Lima sitokin utama diukur adalah sitokin proinflamasi (TNF- α , IFN- γ dan IL-18) dan sitokin antiinflamasi (IL-10 dan IL-4). Pengukuran aras sitokin TNF- α , IFN- γ , IL-10 dan IL-4 dilakukan dengan menggunakan kit ELISA (Qiagen, Jerman) dan IL-18 menggunakan kit ELISA (Sistem R&D, Amerika Syarikat). Serum darah dikumpulkan daripada mencit terjangkit dan kawalan melalui tusukan jantung setelah dimatikan menggunakan gas karbon dioksida. Darah diambil daripada jantung dan dipindahkan ke dalam tiub pengempas steril. Selepas 30 minit, darah beku diempas dengan menggunakan pengempas (Eppendorf, Jerman) selama 10 minit pada 2500 rpm untuk mendapatkan serum. Serum diasingkan dan dianalisis menggunakan kit ELISA.

ANALISIS HISTOPATOLOGI

Untuk kajian histopatologi, lima organ utama iaitu otak, hati, paru-paru, limpa dan buah pinggang telah dikumpulkan daripada haiwan pada hari ke-13 selepas jangkitan dan diawetkan dalam 10% formalin. Hari ke-13 merupakan 24 jam sebelum hari puncak kematian mencit (hari-14). Spesimen organ diproses menggunakan mesin pemprosesan tisu automatik (Leica, Jerman) untuk penyingkiran air daripada tisu organ. Selepas itu, spesimen dibenamkan ke dalam lilin parafin cair menggunakan 'histo-embedder' (Leica, Jerman) dan dipotong menjadi kepingan tebal $4.0 \mu\text{m}$ dengan alat mikrotom (Leica, Jerman). Bahagian tisu kemudiannya diwarnai dengan hematoxilin dan eosin (H&E) menggunakan mesin 'autostainer' (Leica, Jerman). Perubahan morfologi pada tisu mencit terjangkit dan kawalan diperhatikan menggunakan mikroskop cahaya (Leica, Jerman) dengan pembesaran $100\times$, $200\times$, $400\times$ dan $1000\times$ (Basir et al. 2012).

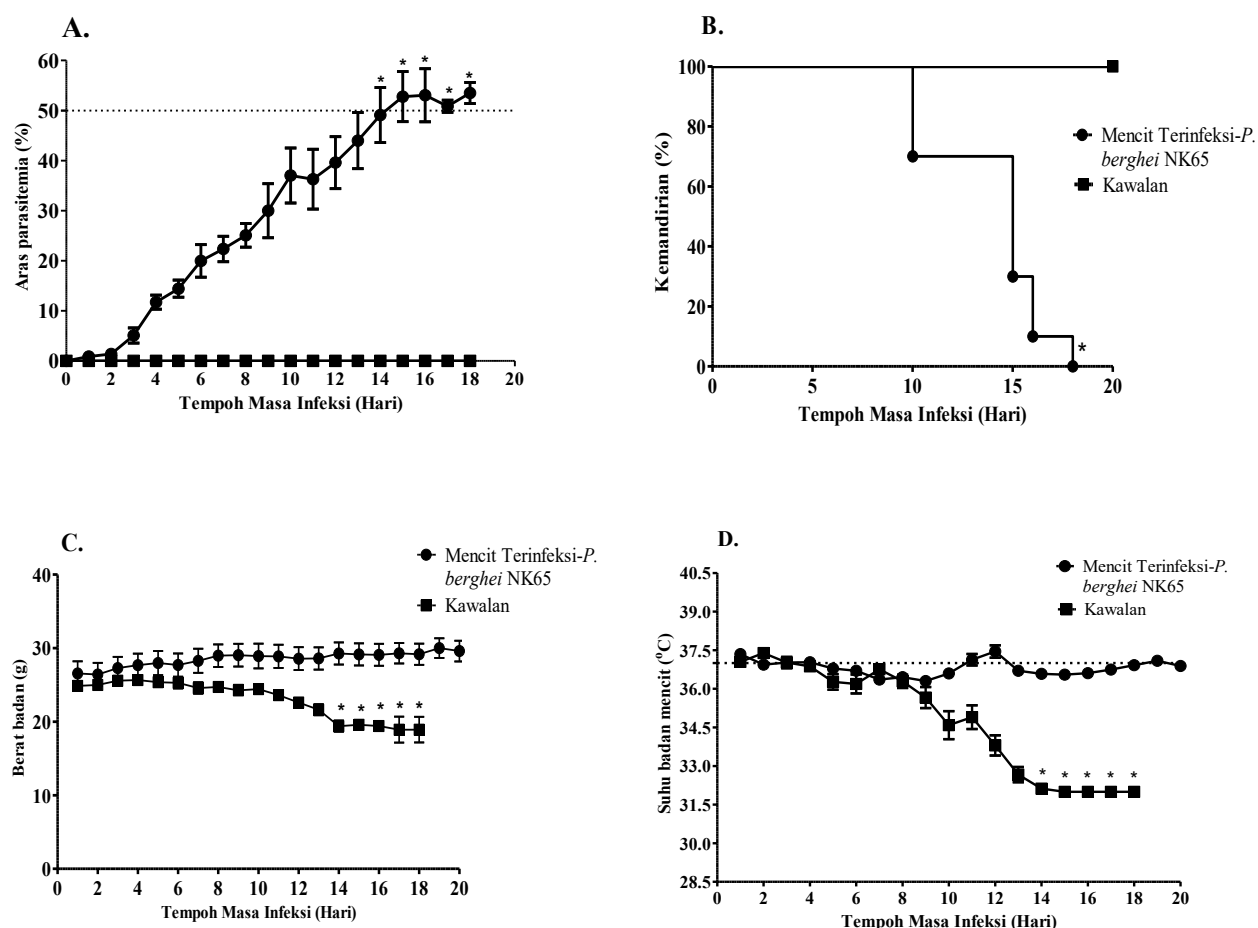
ANALISIS STATISTIK

Data dianalisis menggunakan perisian Graphpad Prism. Purata nilai diukur dalam setiap uji kaji daripada kumpulan terjangkit dan dibandingkan dengan kumpulan kawalan menggunakan ANOVA sehalu (analisis varian) dan ujian Tukey. Semua data dinyatakan sebagai nilai purata \pm sisihan piawai (SD). Nilai $p < 0.05$ diambil sebagai signifikan.

HASIL DAN PERBINCANGAN

Data menunjukkan selepas inokulasi *P. berghei* NK65 ke atas mencit ICR, berlaku peningkatan parasitemia seiring dengan tempoh masa sehingga hari ke-14, hari puncak parasitemia dikesan (Rajah 1(a)). Aras parasitemia memuncak pada hari ke-14 selepas jangkitan iaitu antara 50-55%. Kematian mencit turut menunjukkan peningkatan selepas jangkitan parasit. Sebanyak 30% kematian direkodkan pada hari ke-10, diikuti oleh 70% kematian pada hari-15, 90% kematian pada hari-16 dan 100% kematian direkodkan pada hari ke-18 (Rajah 1(b)). Mencit kawalan tidak menunjukkan tanda dijangkiti dan tiada kematian sepanjang tempoh uji kaji. Dalam kajian lepas yang menggunakan *P. berghei* ANKA oleh Basir et al. (2012), puncak parasitaemia dikesan pada hari ke-6 selepas jangkitan, manakala 100% kematian mencit berlaku seawal hari ke-7 selepas jangkitan. Kajian tersebut menunjukkan mencit terjangkit dengan *P. berghei* ANKA mempunyai ciri-ciri klinikal malaria serebrum dan kematian mencit berlaku dengan lebih pantas. Berbeza dengan kajian ini, jangkitan *P. berghei* NK65 tidak menunjukkan ciri malaria serebrum seperti lumpuh, ataksia, konvulsi dan koma semasa pemantauan dijalankan.

Anemia teruk adalah manifestasi klinikal utama pada manusia dapat dilihat dalam model jangkitan mencit ICR-*P. berghei* NK65 ini. Berlaku penurunan jumlah RBC melebihi 50% semasa fasa kritikal jangkitan. Penyebab anemia adalah hemolisis yang membawa kepada kehilangan sel yang dijangkiti akibat pemecahan atau fagositosis. Di samping itu, penyingkiran sel darah akibat pemekaan antibodi atau perubahan membran fizikokimia dan peningkatan aktiviti retikuloendotelium, terutamanya dalam organ seperti limpa juga menyumbang kepada anemia. Eritropoiesis yang berkurang semasa jangkitan malaria akibat hipoplasia sum-sum tulang dilaporkan mengurangkan penghasilan RBC (Pathak & Ghosh 2016). Hipoksia dan kegagalan jantung kongestif adalah antara komplikasi daripada anemia teruk (Ghali 2009). Nilai purata berat badan mencit yang



RAJAH 1. Aras parasitemia (A), kemandirian (B), berat badan (C) dan suhu badan (D) mencit ICR selepas jangkitan dengan inokulat pRBC 2×10^7 *P. berghei* NK65 secara intraperitonium. Kumpulan kawalan menerima 0.2 mL darah tidak dijangkiti. Data ditunjukkan dalam nilai purata \pm sisihan piawai (SD). Nilai ditanda asterik (*) jika signifikan dengan kawalan, $p < 0.05$

terjangkit parasit telah menunjukkan penurunan dengan ketara berbanding kumpulan kawalan ($p < 0.05$). Purata penurunan berat badan mencit adalah sebanyak 0.6 ± 0.1 g/hari (Rajah 1C). Kumpulan kawalan sebaliknya menunjukkan peningkatan berat badan pada kadar 0.20 ± 0.05 g/hari. Perubahan berat badan mencit yang dijangkiti adalah akibat daripada gangguan fungsi metabolik yang dikaitkan dengan jangkitan malaria apabila pengurangan pengambilan makanan menyebabkan pengurangan berat badan mencit yang terjangkit (Sowunmi et al. 2007). Selain itu, perubahan suhu badan ketara ($p < 0.05$) dikesan pada mencit terjangkit parasit bermula pada hari ke-10 selepas jangkitan. Penurunan suhu badan secara beransur-ansur diperhatikan dengan suhu badan serendah 32°C pada hari ke-14 selepas jangkitan (Rajah

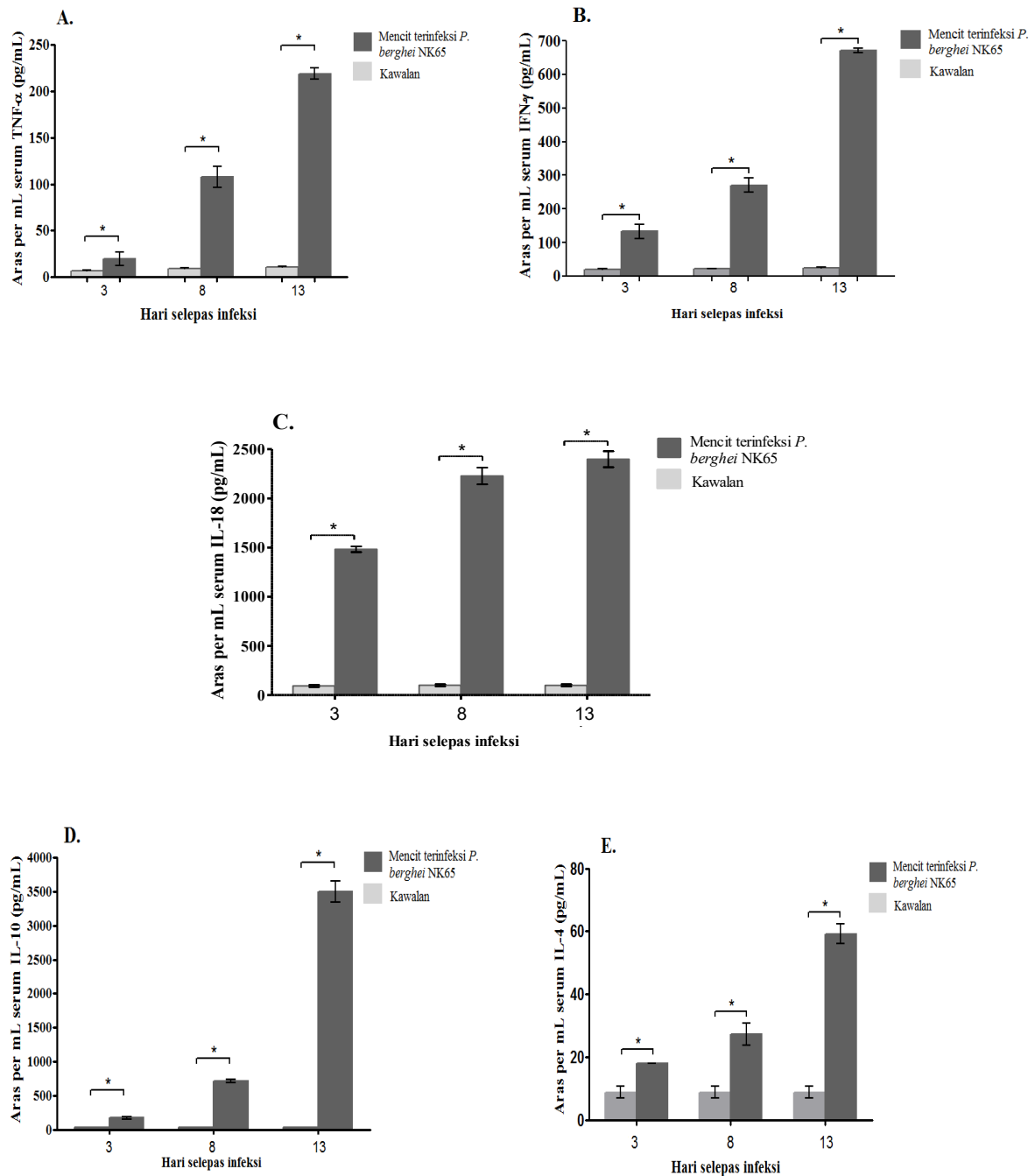
1D). Suhu badan mencit yang dijangkiti berkurang secara perlahan sehingga 32°C menunjukkan bahawa mencit yang dijangkiti mengalami hipotermia. Jangkitan *P. berghei* NK65 pada mencit dikaitkan dengan hipotermia tetapi bukan demam (Hart 1988). Ini disebabkan oleh kesan jangkitan yang melemahkan akibat anemia dan saiz haiwan yang kecil. Haiwan kecil seperti mencit mempunyai nisbah jisim permukaan yang besar, yang mengakibatkan tahap kehilangan haba yang lebih tinggi. Oleh itu, kesan demam yang disebabkan oleh parasit tidak berlaku. Keadaan hipotermia semasa jangkitan juga dikaitkan dengan kelesuan, pengurangan aktiviti lokomotor dan piloereksi pada mencit dapat diperhatikan.

Daripada pemerhatian bedah siasat yang dijalankan ke atas lima organ utama mencit yang terjangkit, tanda

patologi malaria dapat dikenal pasti seperti splenomegali, hepatomegali, warna otak yang pudar, perubahan warna hati, limpa, buah pinggang dan paru-paru berbanding kawalan. Perubahan morfologi fizikal organ seperti splenomegali dan hepatomegali diperhatikan pada mencit yang terjangkit adalah akibat pengumpulan hemozoin pada organ (Egan 2002). Warna pucat pada otak yang diperhatikan pada mencit yang dijangkiti adalah akibat daripada anemia teruk. Tanda fizikal penyakit termasuk piloereksi, kelesuan, penurunan aktiviti lokomotor dan air kencing menjadi gelap atau hitam diperhatikan semasa

fasa akhir jangkitan iaitu fasa kritikal. Air kencing mencit menjadi gelap mirip demam 'blackwater' biasanya dikaitkan dengan jangkitan *P. falciparum* pada manusia (Rivera et al. 2013).

Selepas jangkitan *P. berghei* NK65, semua aras sitokin proinflamasi (TNF- α , IFN- γ dan IL-18) dan sitokin antiinflamasi (IL-10 dan IL-4) telah meningkat dengan ketara ($p < 0.05$) dalam serum mencit terjangkit. Aras tertinggi sitokin serum direkodkan semasa fasa kritikal (Rajah 2). Peningkatan aras sitokin serum TNF- α , IFN- γ , IL-10 dan IL-4 adalah selari dengan tempoh



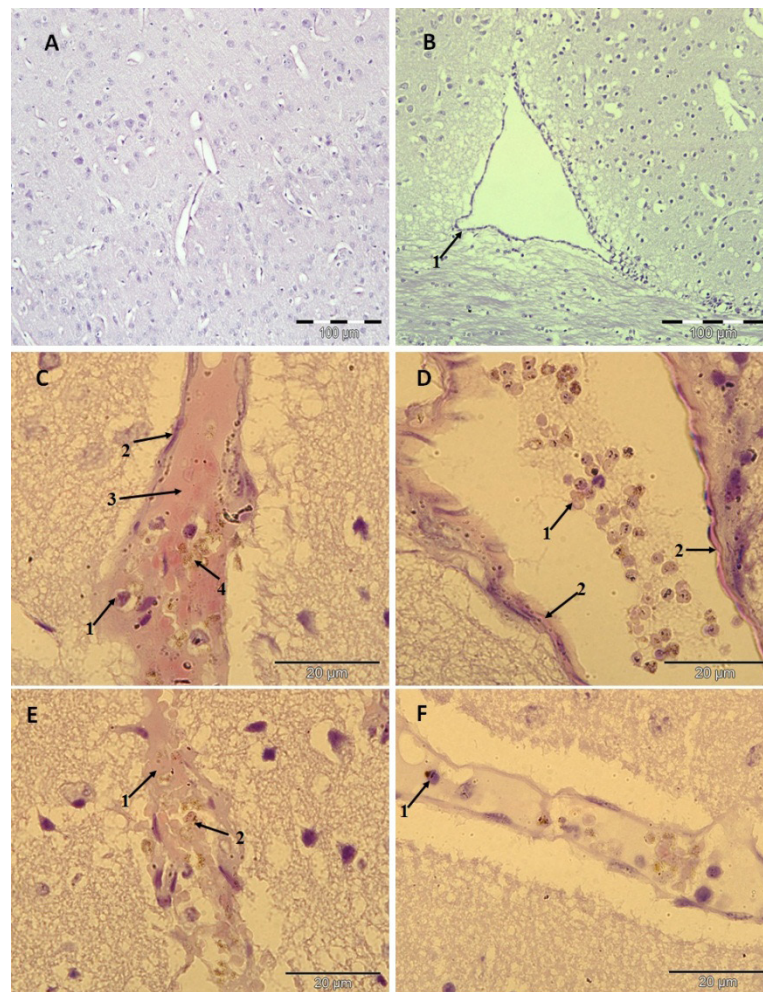
RAJAH 2. Aras sitokin TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-18 (C), IL-10 (D) dan IL-4 (E) dalam serum mencit terjangkit *P. berghei* NK65 dan kawalan. Data ditunjukkan dalam nilai purata \pm sisihan piawai (SD). Nilai ditanda asterik (*) jika signifikan dengan kawalan, $p < 0.05$

masa jangkitan, iaitu aras sitokin lebih rendah pada awal jangkitan dan paling tinggi pada fasa akhir jangkitan. Aras sitokin IL-18 yang agak tinggi direkodkan pada fasa awal jangkitan dan meningkat sepanjang tempoh jangkitan. Pengeluaran berlebihan sitokin inflamasi akibat tindak balas imun yang terlalu aktif adalah petunjuk utama keterukan dalam jangkitan malaria. Dalam model jangkitan mencit ICR- *P. berghei* NK65 ini, kesemua sitokin inflamasi yang diuji iaitu TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-4 dan IL-18 didapati meningkat dengan ketara dalam peredaran serum mencit yang terjangkit berbanding mencit kawalan. Peningkatan aras sitokin inflamasi turut dipantau pada jangkitan *P. berghei* ANKA dengan mencit ICR (Basir et al. 2012). Malaria teruk pada manusia juga menyebabkan simptom yang sama dengan peningkatan aras sitokin inflamasi adalah disebabkan oleh tindak balas imun yang berlebihan sebagai mekanisme pertahanan badan (Artavanis-Tsakonas et al. 2003). TNF- α dilaporkan lebih tinggi dalam plasma kanak-kanak dengan malaria serebrum atau anemia teruk berbanding plasma daripada kes malaria ringan. Patologi malaria serebrum pada pesakit yang dijangkiti *P. falciparum* juga sering dikaitkan dengan peningkatan ketara aras sitokin TNF- α (Gimenez et al. 2003). Dalam erti kata lain, keterukan malaria meningkat seiring dengan peningkatan aras TNF- α dalam darah. Sitokin IFN- γ pula telah dikaitkan dengan patogenesis dan perlindungan terhadap malaria (Angulo & Fresno 2002). Sitokin antiinflamasi IL-10 adalah pengawalatur imun yang diketahui mengawal tindak balas imun berlebihan terhadap malaria, pada masa yang sama diperlukan untuk menyekat patologi teruk semasa jangkitan *Plasmodium* (Niikura et al. 2011). Dalam plasma kanak-kanak di Afrika, aras TNF- α yang tinggi dikawal atur oleh aras IL-10 seiring dengan aras parasitemia dan anemia (Gimenez et al. 2003; Niikura et al. 2011). Aras sitokin IL-18 juga didapati sangat tinggi semasa fasa kritikal akhir jangkitan. Selain itu, terdapat korelasi yang signifikan antara aras IL-18 dan aras parasitemia dalam kalangan pesakit malaria teruk (Nagamine et al. 2003).

Patogenesis utama malaria teruk adalah berkaitan dengan disfungsi pelbagai organ penting. Antara organ utama yang terjejas oleh jangkitan *P. berghei* NK65 dalam mencit ICR ialah otak, hati, limpa, paru-paru dan buah pinggang. Penilaian histopatologi menunjukkan kehadiran pRBC dalam mikrovaskular otak, paru-paru, hati, limpa dan buah pinggang mencit terjangkit *P. berghei* NK65. Dalam salur darah halus otak mencit, leukosit melekat pada dinding endotelium dapat diperhatikan (Rajah 3(B)). Pendarahan intravaskular dan kehadiran pigmen

malaria (Rajah 3(C) & 3(E)) juga dapat diperhatikan dalam saluran darah halus serebrum. Menariknya, terdapat patogenesis neuropatologi pada tisu otak mencit terjangkit iaitu pengumpulan leukosit pada endotelium dan pendarahan intravaskular otak. Pensekuesteran pRBC dalam mikrovaskular otak diperhatikan dalam model jangkitan ini pada hari fasa kritikal akhir jangkitan. Walaupun mencit yang terjangkit tidak menunjukkan sebarang tanda kecederaan neurologi seperti koma, ataksia, konvulsi semasa pemantauan fizikal dijalankan, tetapi analisis histopatologi menunjukkan mencit ICR yang dijangkiti *P. berghei* NK65 mampu mengalami keradangan sistem saraf pusat pada fasa kritikal akhir jangkitan sebelum kematian berlaku. Kajian oleh Lacerda-Queiroz et al. (2011) telah menunjukkan bahawa jangkitan *P. berghei* NK65 terhadap mencit BALB/c dan C57Bl/6 turut menunjukkan tanda neuropatologi seperti edema serebrum, pendarahan perenkima, pengumpulan pRBC dan leukosit pada otak berlaku pada fasa akhir jangkitan sebelum kematian mencit. Menurut Hunt et al. (2006), pensekuesteran pRBC pada endotelium mikrovaskular serebrum akan menyebabkan penyumbatan vaskular dan hipoksia serebrum. Kajian lepas melaporkan mencit CBA/Ca yang terjangkit dengan *P. berghei* ANKA (model malaria serebrum) menunjukkan jumlah hemozoin yang lebih tinggi berbanding jangkitan *P. berghei* NK65 dalam mencit ICR. Ini disebabkan oleh *P. berghei* ANKA menghasilkan lebih banyak hemozoin berbanding NK65 per jumlah bilangan parasit, jadi bilangan hemozoin dalam periferal dan otak adalah lebih tinggi dalam ANKA berbanding NK65 (Sullivan et al. 1996). Aras hemozoin dalam tisu otak adalah petunjuk utama patologi serebrum selain pensekuesteran pRBC, pendarahan, pengumpulan sel mononukleus dan kerosakan endotelium. Bagaimanapun, pendarahan mikro pada otak juga dijumpai dalam jangkitan bukan malaria serebrum, kerana pensekuesteran pRBC adalah tidak khusus (Craig et al. 2012). Kajian lain menunjukkan pensekuesteran sel T CD8+ tidak cukup untuk menyebabkan malaria serebrum pada mencit C57BL/6 dan pensekuesteran pRBC juga adalah bergantung pada sel T CD8+ (Baptista et al. 2010). Justeru, pensekuesteran pRBC dalam model kajian mencit ICR-*P. berghei* NK65 ini tidak semestinya mengaruh malaria serebrum.

Paru-paru daripada mencit yang terjangkit menunjukkan pembentukan membran hialin (Rajah 4(B)). Ruang alveolar paru-paru dipenuhi dengan cecair di beberapa kawasan yang jelas menunjukkan edema pulmonari (Rajah 4(D)). Pengumpulan hemozoin berlaku



RAJAH 3. Perlekatan leukosit pada endotelium otak mencit (B1), pensekuesteran pRBC dalam salur darah serebrum (D1), pendarahan intravaskular (C3 & E1), pendarahan perivaskular (D2) dan pigmen malaria (C4 & E2) diperhatikan pada mencit terjangkit. Kehadiran limfosit intravaskular (C1 & F1) dan makrofaj perivaskular (C2) dikesan. Slaid histologi diperhatikan pada pembesaran mikroskopi 200 dan 1000×

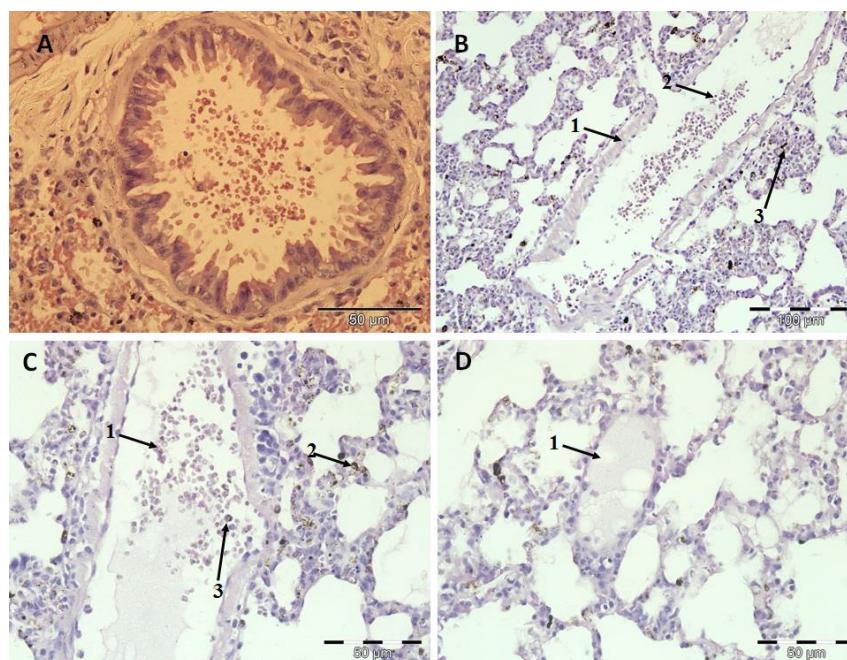
dalam tisu parenkima paru-paru (Rajah 4(B) & 4(C)) dan terdapat makrofaj yang menyelubungi pigmen diperhatikan (Rajah 4(C)). Edema pulmonari berlaku pada paru-paru mencit terjangkit yang merupakan ciri penting malaria teruk. Selain itu, pembentukan hialin pada membran boleh menyebabkan pertukaran gas melalui membran alveolar tidak berkesan dan membawa kepada komplikasi jangkitan *P. falciparum* yang paling serius (Van den Steen et al. 2013). Daripada pemeriksaan mikroskopik tisu hati, sel inflamasi jelas diperhatikan (Rajah 5(B)). Kepadatan mikrovaskular dengan pRBC dan limfosit juga berlaku yang membawa

kepada penyumbatan salur darah di hati. Di samping itu, hiperemia yang disertai dengan pengembangan kapilari jelas diperhatikan pada hati mencit (Rajah 5(C)), bersama-sama dengan pengumpulan hemozoin (Rajah 5(B) & 5(D)). Ciri histopatologi yang serupa diperhatikan dalam hati semasa jangkitan *P. falciparum* seperti pada manusia contohnya makrofaj menelan pRBC yang menyebabkan lisis sel darah dan meninggalkan hemozoin yang termendap dalam sel parenkima (Urban & Roberts 2002). Splenomegali adalah fenomena biasa dalam jangkitan malaria teruk kerana limpa menjadi bengkak dengan hemozoin mengakibatkan trabekula dan folikel tidak

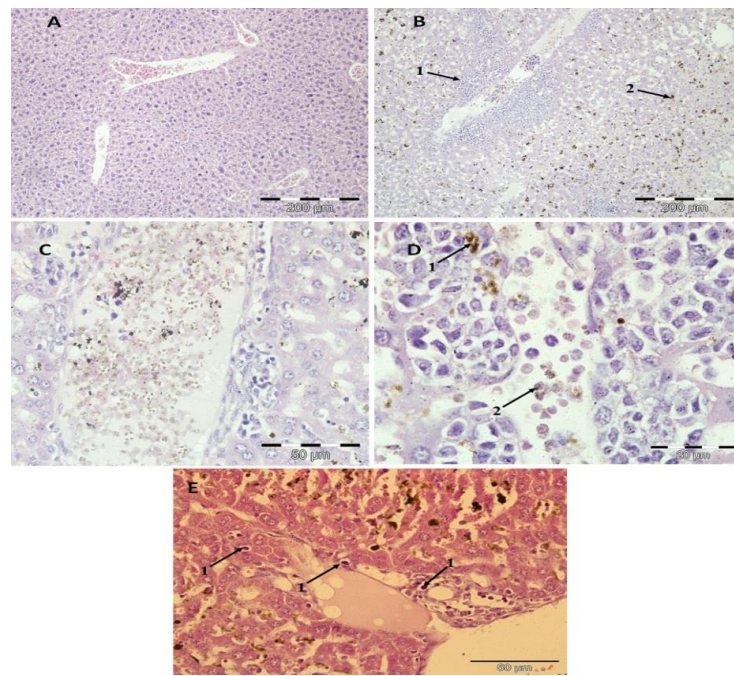
jas (Urban et al. 2005). Limpa mencit yang dijangkiti malaria pula menunjukkan pembesaran pulpa merah dan putih disertai dengan kehilangan struktur tipikal pada pusat germinal (Rajah 6(B)). Pigmen malaria dilihat dengan banyak dalam pulpa, sel histiosit ditemui pada lapisan sinusoidal dan juga dalam mikrovaskular limpa (Rajah 6(C), 6(D) & 6(E)). Dalam limpa, pendarahan fokal ditemui (Rajah 6(D)) dan penebalan trabekula juga diperhatikan (Rajah 6(F)). Tisu buah pinggang menunjukkan mikrovaskular dan interstitium dijangkiti dengan pRBC, pengumpulan sel inflamasi dan hemozoin (Rajah 7(B), 7(D) & 7(E)). Pendarahan kortikal juga diperhatikan pada buah pinggang mencit yang terjangkit (Rajah 7(F)). Ciri histopatologi tisu buah pinggang dalam jangkitan *P. berghei* NK65 adalah pembentukan hialin dan vakuolasi dalam tubul serta pengumpulan hemozoin juga merupakan ciri histopatologi tipikal jangkitan *P. falciparum* pada manusia (Nayak et al. 2014).

Malaria teruk adalah penyakit 'proteiform' dengan pelbagai tanda dan gejala. Secara umumnya, ciri klinikal

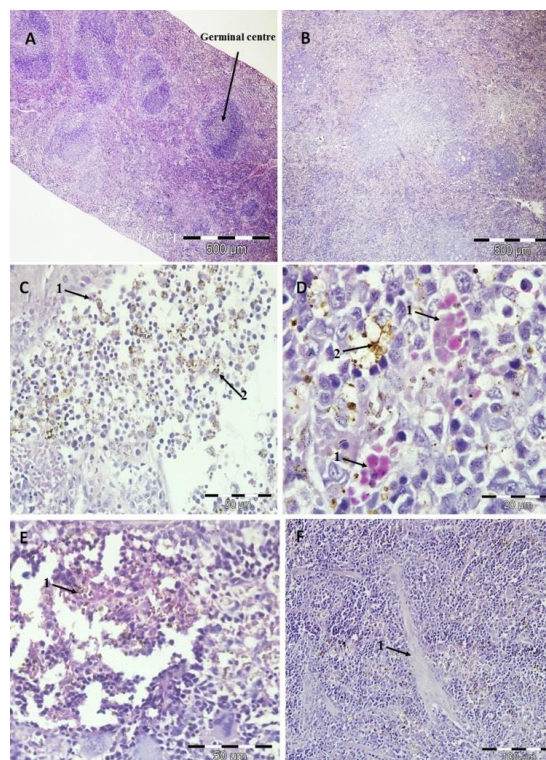
utama malaria teruk ialah malaria serebrum, anemia, kegagalan buah pinggang akut, sindrom gangguan pernafasan, kerosakan pengaliran darah, hemoglobinuria dan metabolik asidosis (Hunt et al. 2006; Miller et al. 2002). Mana-mana komplikasi ini boleh berkembang dengan cepat dan menyebabkan kematian dalam beberapa jam atau hari (WHO 2000). Kebiasaannya malaria teruk adalah disebabkan oleh jangkitan *P. falciparum* pada manusia. Data yang diperolehi daripada kajian ini menunjukkan bahawa jangkitan *P. berghei* NK65 adalah virulen kepada mencit ICR, mirip malaria teruk yang dikaitkan dengan jangkitan *P. falciparum* pada manusia. Simptom malaria daripada model haiwan kajian ini tidak menyebabkan malaria serebrum, walaupun menunjukkan ciri neuropatologi pada fasa kritikal jangkitan. Bagaimanapun, kematian mencit, anemia teruk, kerosakan hati, buah pinggang dan limpa, splenomegali, hepatomegali dan simptom kerosakan pernafasan akut merupakan komplikasi utama jangkitan malaria teruk mirip komplikasi jangkitan *P. falciparum* pada manusia.



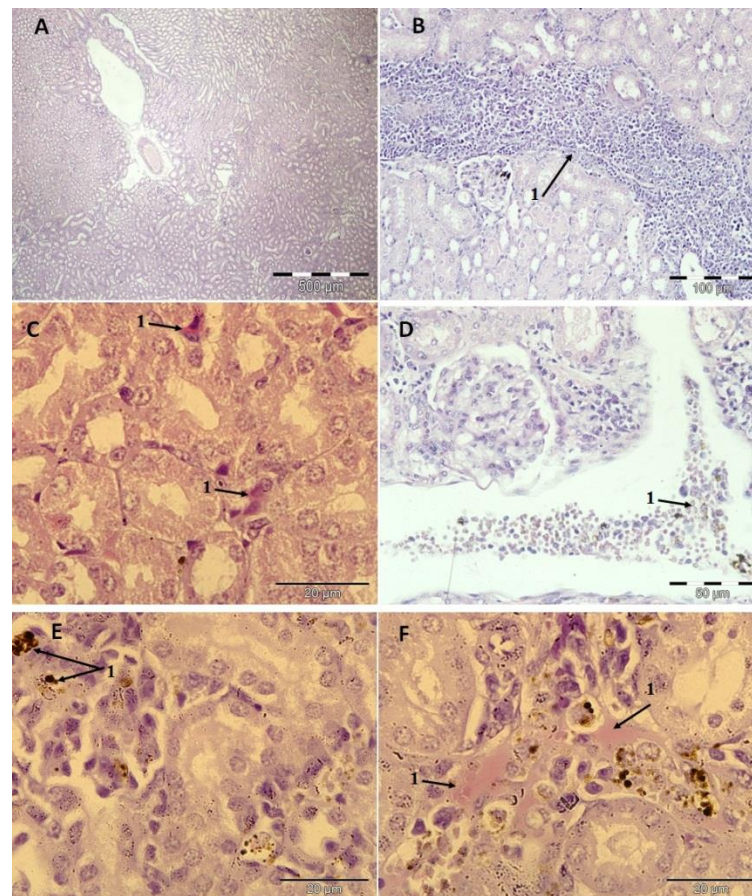
RAJAH 4. Pembentukan hialin membran (B1) pada paru-paru mencit terjangkit, pensekuesteran pRBC (B2 & C1) dan pengumpulan pigmen malaria (B3 & C2) diperhatikan. Alveolus dipenuhi dengan makrofaj (C3) dan edema pulmonari (D1) berbanding mencit kawalan (A). Slaid histologi diperhatikan pada pembesaran mikroskopi 200 dan 400×



RAJAH 5. Sel inflamasi berkumpul pada salur darah hati (B1) dan pengumpulan pigmen malaria diperhatikan (B2 & D1). Mikrovaskular mengalami kesesakan dengan pRBC (D2), dan limfosit, berlaku hiperemia di hati (C). Peningkatan makrofaj sinosidal menunjukkan hiperplasia dan hipertrofi sel Kupffer (E1) berbanding mencit kawalan (A). Slaid histologi diperhatikan pada pembesaran mikroskopi 100, 400 dan 1000×



RAJAH 6. Pulpa merah dan putih limpa mencit terjangkit membesar dan kehilangan struktur tipikal pusat germinal (B). Pengumpulan hemozoin (C2, D2 & E1) dan pensekuesteran pRBC (C1) diperhatikan pada pulpa histiosid dan dinding sinusoidal. Pendarahan fokal (D1) dan penebalan dinding trabekular (F1) diperhatikan berbanding struktur organ mencit tidak terjangkit (A). Slaid histologi diperhatikan pada pembesaran mikroskopi 100, 400 dan 1000×



RAJAH 7. Tisu korteks buah pinggang mencit menunjukkan taburan sel inflamasi pada mikrovaskular dan interstitium (B1), Pengumpulan hemozoin (E1) dan pensekuesteran pRBC (D1) berlaku. Pendarahan fokal (C1) pada medula dan pendarahan kortikal (F1) diperhatikan berbanding kumpulan mencit tanpa jangkitan (A). Slaid histologi diperhatikan pada pembesaran mikroskopi 400 dan 1000 \times

KESIMPULAN

Kesimpulannya, model jangkitan mencit ICR-*P. berghei* NK65 yang digunakan dalam kajian ini menunjukkan ciri-ciri jangkitan malaria teruk seperti yang ditunjukkan dalam analisis histologi dan sitokin iaitu perlekatan leukosit pada endotelium, pensekuesteran pRBC dalam salur darah serebrum, pendarahan intravaskular pada organ utama, peningkatan sitokin proinflamasi (TNF- α , IFN- γ , dan IL-18) dan sitokin antiinflamasi (IL-10 dan IL-4) berlaku pada haiwan kajian. Model jangkitan ini boleh digunakan untuk memajukan lagi perkembangan pengetahuan dan kefahaman manusia tentang patogenesis dan patologi yang berlaku dalam malaria teruk serta boleh digunakan sebagai model rujukan jangkitan malaria teruk pada masa akan datang.

PENGHARGAAN

Penyelidikan ini dibiayai melalui geran penyelidikan daripada Universiti Kebangsaan Malaysia (GUP-2021-047) dan Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi (MOSTI), Malaysia (02-01-02-SF1248). Penghargaan kepada Pn. Juita binti Chupri daripada Jabatan Patologi, Fakulti Perubatan dan Sains Kesihatan, Universiti Putra Malaysia atas bantuan teknikal yang diberikan.

RUJUKAN

Aizuddin, N.N.F., Ganesan, N., Ng, W.C., Ali, A.H., Ibrahim, I., Basir, R., Embi, N. & Hasidah, M.S. 2020. GSK3 β : A plausible molecular target in the cytokine-modulating effect of exogenous insulin in a murine model of malarial infection. *Tropical Biomedicine* 37(4): 1105-1116.

- Amal, R.N., Noor Hayati, M.I. & Chan, B.T.E. 2006. A retrospective study on malaria cases admitted to Hospital Universiti Kebangsaan Malaysia (HUKM). *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences* 2: 41-49.
- Angulo, I. & Fresno, M. 2002. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9(6): 1145-1152.
- Artavanis-Tsakonas, K., Tongren, J.E. & Riley, E.M. 2003. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clinical & Experimental Immunology* 133(2): 145-152.
- Bagot, S., Campino, S., Penha-Gonçalves, C., Pied, S., Cazenave, P.A. & Holmberg, D. 2002. Identification of two cerebral malaria resistance loci using an inbred wild-derived mouse strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(15): 9919-9923.
- Basir, R., Rahiman, S.F., Hasballah, K., Chong, W.C., Talib, H., Yam, M.F., Jabbarzare, M., Tie, T.H., Othman, F., Moklas, M.A.M. & Abdullah, W.O. 2012. *Plasmodium berghei* ANKA infection in ICR mice as a model of cerebral malaria. *Iranian Journal of Parasitology* 7(4): 62.
- Baptista, F.G., Pamplona, A., Pena, A.C., Mota, M.M., Pied, S. & Vigário, A.M. 2010. Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infection and Immunity* 78(9): 4033-4039.
- Craig, A.G., Grau, G.E., Janse, C., Kazura, J.W., Milner, D., Barnwell, J.W., Turner, G. & Langhorne, J. 2012. The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathogens* 8(2): e1002401.
- De Souza, J.B. & Riley, E.M. 2002. Cerebral malaria: The contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection* 4(3): 291-300.
- Dian, N.D., Mohd Salleh, A.F., Rahim, M.A.F.A., Munajat, M.B., Abd Manap, S.N.A., Ghazali, N., Hassan, N.W. & Idris, Z.M. 2021. Malaria cases in a tertiary hospital in Kuala Lumpur, Malaysia: A 16-Year (2005-2020) retrospective review. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 6: 177.
- Druihhe, P., Hagan, P. & Rook, G.A. 2002. The importance of models of infection in the study of disease resistance. *Trends in Microbiology* 10(10): s38-s46.
- Egan, T.J. 2002. Physico-chemical aspects of hemozoin (malaria pigment) structure and formation. *Journal of Inorganic Biochemistry* 91(1): 19-26.
- Ghali, J.K. 2009. Anemia and heart failure. *Current Opinion in Cardiology* 24(2): 172-178.
- Gimenez, F., de Lagerie, S.B., Fernandez, C., Pino, P. & Mazier, D. 2003. Tumor necrosis factor α in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60(8): 1623-1635.
- Hart, B.L. 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 12(2): 123-137.
- Hunt, N.H., Golenser, J., Chan-Ling, T., Parekh, S., Rae, C., Potter, S., Medana, I.M., Miu, J. & Ball, H.J. 2006. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *International Journal for Parasitology* 36(5): 569-582.
- Lacerda-Queiroz, N., Lima, O.C.O., Carneiro, C.M., Vilela, M.C., Teixeira, A.L., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M.S.S., Martins-Filho, O.A., Braga, É.M. & Carvalho-Tavares, J. 2011. *Plasmodium berghei* NK65 induces cerebral leukocyte recruitment *in vivo*: An intravital microscopic study. *Acta Tropica* 120(1): 31-39.
- Lai, M.Y., Rafieqin, N., Lee, P.L., Rawa, A., Dzul, S., Yahaya, N., Abdullah, F.H., Othman, N., Jelip, J., Ooi, C.H. & Ibrahim, J. 2021. High incidence of *Plasmodium knowlesi* malaria compared to other human malaria species in several hospitals in Malaysia. *Tropical Biomedicine* 38(3): 248-253.
- Li, C., Seixas, E. & Langhorne, J. 2001. Rodent malarial: The mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Medical Microbiology and Immunology* 189(3): 115-126.
- Mackintosh, C.L., Beeson, J.G. & Marsh, K. 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in Parasitology* 20(12): 597-603.
- Menendez, C., Fleming, A.F. & Alonso, P.L. 2000. Malaria-related anaemia. *Parasitology Today* 16(11): 469-476.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. & Doumbo, O.K. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415(6872): 673-679.
- Nagamine, Y., Hayano, M., Kashiwamura, S.I., Okamura, H., Nakanishi, K., Krudsod, S., Wilairatana, P., Looareesuwan, S. & Kojima, S. 2003. Involvement of interleukin-18 in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97(2): 236-241.
- Nayak, K.C., Kumar, S., Gupta, B.K., Kumar, S., Gupta, A., Prakash, P. & Kochar, D.K. 2014. Clinical and histopathological profile of acute renal failure caused by *falciparum* and *vivax* mono-infection: An observational study from Bikaner, northwest zone of Rajasthan, India. *Journal of Vector Borne Diseases* 51(1): 40.
- Niikura, M., Inoue, S.I. & Kobayashi, F. 2011. Role of interleukin-10 in malaria: Focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *BioMed Research International* 2011: 383962.
- Nimir, A.R., Isa, N.H.M., Chan, B.T.E., Ghauth, I.M., Salleh, F.M. & Rahman, R.A. 2006. Severity of malaria cases reported in urban and rural hospitals in Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 37(5): 831.
- Pathak, V.A. & Ghosh, K. 2016. Erythropoiesis in malaria infections and factors modifying the erythropoietic response. *Anemia* 2016: 9310905.

- Perkins, D.J., Were, T., Davenport, G.C., Kempaiah, P., Hittner, J.B. & Ong'echa, J.M. 2011. Severe malarial anemia: Innate immunity and pathogenesis. *International Journal of Biological Sciences* 7(9): 1427.
- Rahim, M.A.F.A., Munajat, M.B. & Idris, Z.M. 2020. Malaria distribution and performance of malaria diagnostic methods in Malaysia (1980-2019): A systematic review. *Malaria Journal* 19(1): 1-12.
- Rivera, N., Romero, S.E., Menchaca, Á., Zepeda, A., García, L.E., Salas, G., Romero, L. & Malagón, F. 2013. Blackwater fever like in murine malaria. *Parasitology Research* 112(3): 1021-1029.
- Sexton, A.C., Good, R.T., Hansen, D.S., Ombrain, M.C.D., Buckingham, L., Simpson, K. & Schofield, L. 2004. Transcriptional profiling reveals suppressed erythropoiesis, up-regulated glycolysis, and interferon-associated responses in murine malaria. *Journal of Infectious Diseases* 189(7): 1245-1256.
- Sowunmi, A., Gbotosho, G.O., Adedeji, A.A., Fateye, B.A., Sabitu, M.F., Happi, C.T. & Fehintola, F.A. 2007. Effects of acute *Plasmodium falciparum* malaria on body weight in children in an endemic area. *Parasitology Research* 101(2): 343-349.
- Stoute, J.A., Odindo, A.O., Owuor, B.O., Mibei, E.K., Opollo, M.O. & Waitumbi, J.N. 2003. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. *The Journal of Infectious Diseases* 187(3): 522-525.
- Sullivan, A.D., Ittarat, I. & Meshnick, S.R. 1996. Patterns of haemozoin accumulation in tissue. *Parasitology* 112(3): 285-294.
- Urban, B.C. & Roberts, D.J. 2002. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: Sticking of infected erythrocytes switches off host cells. *Current Opinion in Immunology* 14(4): 458-465.
- Urban, B.C., Hien, T.T., Day, N.P., Phu, N.H., Roberts, R., Pongponratn, E., Jones, M., Mai, N.T., Bethell, D., Turner, G.D. & Ferguson, D. 2005. Fatal *Plasmodium falciparum* malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization. *Infection and Immunity* 73(4): 1986-1994.
- Van den Steen, P.E., Deroost, K., Deckers, J., Van Herck, E., Struyf, S. & Opdenakker, G., 2013. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Trends in Parasitology* 29(7): 346-358.
- World Health Organization 2021. Geneva: World Malaria Report. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>. Accessed on 1 March 2022.
- World Health Organization. 2000. Severe *falciparum* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94: 1-90.
- Yoshimoto, T., Takahama, Y., Wang, C.R., Yoneto, T., Waki, S. & Nariuchi, H. 1998. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. *The Journal of Immunology* 160(11): 5500-5505.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: jalifah@ukm.edu.my