

بررسی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در پلاسمودیوم فالسی پاروم مقاوم به کلروکین در دو سال متوالی در شهرستان چابهار

عبدالحسین دلیمی^۱، فاطمه جالوسیان^{۲*}، سیامک میرابسمعی^۳، فاطمه غفاری فر^۴، فرامرز سلیمانلو^۵، رامین نقی‌زاده^۶

۱- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، آزمایشگاه کنترل غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- استادیار، آزمایشگاه بیوتکنولوژی، کلینیک تخصصی دی، تهران، ایران

۶- کارشناس ارشد، آزمایشگاه بیوتکنولوژی، کلینیک تخصصی دی، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۲۰

دریافت مقاله: ۸۷/۸/۵

چکیده

هدف: مقاومت دارویی پلاسمودیوم فالسی پاروم نسبت به کلروکین مشکل اصلی در مناطق مالاریا خیز است. وجود ارتباط بین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های *pfmdr1* و *pfcr1* پلاسمودیوم فالسی پاروم با مقاومت نسبت به کلروکین شناخته شده است. در این مطالعه پنج چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ژن *pfmdr1* و یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ژن *pfcr1* با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور ۲۶ نمونه خون از افراد آلوده به پلاسمودیوم فالسی پاروم و مقاوم به کلروکین از بندر چابهار در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد. این جهش‌ها با استفاده از روش Light CyclerTM و پروب‌های دوره‌سازی شناسایی شدند.

نتایج: طبق نتایج این مطالعه در کدون ۸۶ ژن *pfmdr1* تعداد ۶ نمونه (۲۳ درصد) از مجموع ۲۶ نمونه مورد مطالعه جهش مشاهده شد. گرچه این جهش در سال اول مطالعه، دیده نشد ولی در سال دوم قابل ملاحظه بود. جهش K76T ژن *pfcr1* در کدون CVMNT ژن *pfcr1* در (۴۲/۳ درصد) ۱۱ نمونه‌ها و در کدون‌های CVIET در (۲۶/۹ درصد) نمونه‌ها، SVIET تنها در دو نمونه (۷/۶ درصد) و SVMNT در ۵ نمونه (۱۹/۲ درصد) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: جهش در طول دو سال مطالعه افزایش یافته است. نتایج مطالعه نشان داد که چندشکلی نوکلئوتیدی مربوط به ژن‌های *pfmdr1* و *pfcr1* در منطقه وجود دارد که این موضوع می‌تواند به‌عنوان نشانگری برای کنترل مالاریا در چابهار مدنظر باشد.

کلیدواژگان: پلاسمودیوم فالسی پاروم مقاوم به کلروکین، ایران، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، *pfmdr1*، *pfcr1*

۱- مقدمه

کشور ماست. این بیماری به علت ایجاد کم‌خونی و ضعف و ناتوانی باعث اتلاف نیروی کار شده و بر وضعیت اقتصادی و

مالاریا (Malaria) یک بیماری انگلی و یکی از مسائل مهم بهداشتی تعدادی از کشورهای مناطق گرمسیری دنیا و از جمله

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱-۴۱۱۵

کشاورزی این کشورها اثر می‌گذارد [۱]. در کشور ما این بیماری در مناطق جنوبی و جنوب شرقی دیده می‌شود. شهرستان چابهار در منتهی‌الیه جنوب شرقی استان سیستان و بلوچستان در کنار آب‌های گرم دریای عمان واقع شده و مرکز آن شهر چابهار است. در این شهر علاوه شیوع این بیماری، مقاومت دارویی پلاسمودیوم فالسی‌پاروم (*Plasmodium falciparum*) نسبت به کلروکین (Chloroquin) گزارش شده است. مقاومت دارویی در پلاسمودیوم فالسی‌پاروم به معنی توانایی سویه انگل در زنده ماندن و تکثیر در حضور غلظت‌هایی از داروست که به‌طور معمول انگل‌های همان نوع پلاسمودیوم را از بین برده یا از تکثیر آن‌ها جلوگیری می‌کند [۲].

از سال ۱۳۶۲ بررسی حساسیت پلاسمودیوم فالسی‌پاروم در شرایط دریدن (*in vivo*) و آزمایشگاهی (*in vitro*) نسبت به تعدادی از داروهای ضد مالاریا به‌خصوص کلروکین در ایستگاه‌های تحقیقاتی بندرعباس و ایرانشهر توسط دکتر ادریسیان (Edrisian) و همکاران آغاز شد [۲]. این تحقیقات در ایران وجود مقاومت نسبت به کلروکین را اثبات نمودند. طی بررسی‌های ادریسیان و همکاران که به‌ترتیب در سال‌های ۹۳-۱۹۹۰ و سپس ۹۶-۱۹۹۴ در هر سه استان هرمزگان، سیستان و بلوچستان و کرمان انجام گرفت به‌ترتیب ۷۳/۴ درصد و ۶۰/۲ درصد موارد نسبت به کلروکین مقاوم بودند [۳].

تحقیقات محققان در کشورهای مالاریاخیز نشان داد که جهش‌های ژن *pfmdr1* تا حدی باعث مقاومت به کلروکین می‌شود [۴]. اما بروز آرام مقاومت به کلروکین در مقایسه با ظهور سریع مقاومت انتخابی به داروهای آنتی‌فولات دخالت یک مکانیسم وابسته به چند ژن (Multigenic) را نشان می‌دهد. نتایج مطالعات برخی از محققان نیز همراهی دو ژن *pfmdr1* و *pfcr1* به‌جای یک ژن مرتبط با مقاومت انگل را نشان می‌دهد [۵]. یکی از اهداف تعیین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphisms: SNPs) تعیین منشأ بیماری‌ها و نقشه گسترش بیماری‌های واگیر است تا جهش‌های جدید را ردیابی و تشخیص نمایند این جهش‌ها ممکن است مقاومت به داروها را ایجاد کنند به‌همین دلیل

مطالعه بر ژنوتیپ SNPs اطلاعات بسیار با ارزشی برای کنترل دقیق درمان بیماری‌ها ارائه می‌دهد. تشخیص بیماری‌ها با استفاده از روش‌های تشخیصی دقیق همواره مورد توجه محققان بوده است، توانایی تشخیص جهش‌ها یا الگوی آن‌ها به محققین اجازه می‌دهد که ارتباط عوامل بیماری‌ها را با مقاومت دارویی پیدا کنند. دقت مهم‌ترین ویژگی است که اغلب محققین برای تعیین ژنوتیپ SNPs در نظر می‌گیرند [۵]. در این مطالعه از پروب‌های دورگه‌سازی (Hybridization probes) استفاده شد که به‌طور اختصاصی و دقیق SNPs را تشخیص می‌دهند. پروب‌های دورگه‌سازی شامل نوکلئوتیدهای متفاوت هستند که به توالی داخلی تکثیر شده توسط آغازگرهای (Primers) رفت و برگشت باند می‌شوند [۵]. سیستم‌های Real-time PCR به تعیین و اندازه‌گیری آشکارگر فلورسنتی وابسته است که علائم (Signals) این آشکارگر فلورسنتی نسبت مستقیمی با مقدار محصول PCR در واکنش دارد. در نتیجه این روش یک سیستم قوی برای تعیین ژنوتیپ SNPs به‌شمار می‌آید. با توجه به این‌که برای تعیین جهش‌های احتمالی در ژن‌های پلاسمودیوم فالسی‌پاروم تاکنون در ایران فقط مطالعه معدودی صورت گرفته است [۶، ۷] و در هیچ‌کدام از این مطالعات از روش Real-time PCR برای این منظور استفاده نشده است، بنابراین هدف این تحقیق بررسی و تشخیص جهش‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های *pfmdr1* و *pfcr1* پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین با استفاده از روش Real-time PCR بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه

۲۶ نمونه خون افراد آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم در شهرستان چابهار که آلودگی آن‌ها با گسترش نازک و ضخیم لام خون محیطی تأیید شده بود، جمع‌آوری شد. تمام این نمونه‌ها از بیمارانی که به درمان دارویی کلروکین طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) پاسخ

می‌گیرند و پدیده انتقال انرژی رزونانس فلورسنت (Florescence Resonance Energy Transfer: FRET) بین آن‌ها رخ می‌دهد [5].

برای کدون ۸۶ و ۱۸۴، برنامه PCR به این شرح بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹ دقیقه و ۳۵ چرخه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و با برنامه ذوب ۳۵-۷۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت تغییر دما (Temperature Transition Rate: TTR) ۰/۲ درجه در ثانیه ادامه یافت.

برای کدون ۱۰۳۴ و ۱۰۴۲ و ۱۲۴۶ شرایط به این صورت بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹ دقیقه و ۴۰ چرخه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه و با برنامه ذوب ۳۵-۸۰ درجه سانتی‌گراد و TTR ۰/۲ درجه در ثانیه ادامه یافت.

۲-۴- تعیین جهش‌های *Pfprt*

برای تعیین جهش‌های ژن *pfprt* آغازگر پایین دست در انتهای 3' با Light Cycler red 640 نشاندار شده که به‌عنوان پروب آنکور است، طی مراحل تکثیر، این آغازگر (که آغازگر برگشت است) تولید می‌شود و پدیده FRET بین پروب حس‌گر و محصول PCR که به‌عنوان پروب آنکور است رخ می‌دهد [5].

سپس دمای ذوب اختصاصی هر ژنوتیپ تعیین شد: پروب حس‌گر حتی با وجود عدم تطابق یک نوکلئوتید هم می‌تواند به توالی هدف متصل شود اما نسبت به پروب حس‌گری که کاملاً تطابق دارد در دمای پایین‌تری جدا می‌شود [5].

برای کدون‌های مختلف *Pfprt* پس از مرحله اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، با ۴۰ چرخه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه با برنامه ذوب ۳۲-۷۲ درجه سانتی‌گراد و TTR ۰/۲ درجه در ثانیه ادامه یافت.

در هر بار آزمایش (run) هر سه نمونه مرجع و کنترل‌های

منفی داده بودند تهیه شد.

تعداد ۷ نمونه در سال اول و ۱۹ نمونه در سال دوم تحقیق جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها در شهرستان چابهار جمع‌آوری شد و سپس به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شد و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام نمونه‌ها از افراد ایرانی آلوده ساکن چابهار جمع‌آوری شد. DNA این نمونه‌ها با استفاده از کیت (QIAGEN) QIAamp DNA minikit استخراج شد.

۲-۲- سویه‌های مرجع پلاسمودیم فالسی پاروم

سه سویه پلاسمودیم فالسی پاروم که حساسیت و مقاومت آن‌ها به کلروکین تعیین شده بود به‌عنوان مرجع انتخاب شدند. سویه 3D7، حساس به کلروکین است (از هلند است) و سویه‌های W2 و 7G8 مقاوم به کلروکین هستند (سویه W2 از جنوب شرق آسیا و 7G8 از برزیل است). این سویه‌ها از محیط کشت برداشته و به‌صورت نقطه‌گذاری شده روی کاغذ واتمن توسط دی‌مونبریسون (de Monbrison) از فرانسه ارسال شدند.

۲-۳- تعیین جهش‌های *pfmdr1*

تشخیص جهش‌ها با استفاده از Light cycler و پروب‌های دوره‌سازی انجام شد.

برای جهش‌های *pfmdr1* پروب‌های دوره‌سازی شامل دو الیگونوکلئوتید متفاوت بودند که به توالی داخلی تکثیر شده توسط آغازگرهای رفت و برگشت متصل می‌شوند.

پروب حس‌گر (Sensor probe)، در انتهای 3' با فلورسئین نشاندار شده است و برای تشخیص ناحیه دارای جهش طراحی شده است. پروب آنکور (Anchor probe)، در انتهای 5' با Light Cycler Red 640 نشاندار شده است و در انتهای 3' فسفوریله شده است تا از تولید شدن توسط آنزیم تک پلیمرراز جلوگیری شود، این پروب برای اتصال به ناحیه مجاور با ناحیه دارای جهش یافته طراحی شده است. هر دو پروب روی یک رشته DNA متصل می‌شوند و دو تا رنگ فلورسنت در مجاورت همدیگر قرار

هاپلو تیپ CVMK مشاهده نشد. نسبت این جهش در سال اول مطالعه به مراتب کمتر از سال دوم بوده است.

جدول ۲ فراوانی جهش K76T ژن *pfcr1* در میان ۲۶ نمونه خون افراد آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین در چابهار

نمونه‌ها	کدون‌ها				
	CVMK* (درصد)	SVMNT (درصد)	SVIET (درصد)	CVMNT (درصد)	CVIET (درصد)
کل نمونه‌ها (تعداد=۲۶)	۱ (۳/۸)	۵ (۱۹/۲)	۲ (۷/۶)	۱۱ (۴۲/۳)	۷ (۲۶/۹)
سال اول نمونه‌گیری (تعداد=۷)	۰ (۰)	۱ (۱۴/۳)	۰ (۰)	۵ (۷۱/۴)	۱ (۱۴/۳)
سال دوم نمونه‌گیری (تعداد=۱۹)	۱ (۵/۲)	۴ (۲۱)	۲ (۱۰/۵)	۶ (۳۱/۶)	۶ (۳۱/۶)

* در این کدون جهش K76T مشاهده نشد.

منحنی‌های تجزیه و تحلیل دمای ذوب نمونه‌های خون آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم و سویه‌های مرجع برای تشخیص جهش K76T ژن *pfcr1* در شکل ۱ آمده است. منحنی پنج نمونه با منحنی سویه استاندارد 7G8 (سویه مقاوم) که حاوی جهش K76T است کاملاً مطابقت دارد بدین معنی که دمای ذوب آن‌ها $۴۳/۷ \pm ۰/۲$ بوده است که متفاوت با دمای ذوب سویه حساس D73 است.

۴- بحث

با تجزیه و تحلیل منحنی دمای ذوب در روش Real-time PCR می‌توان به‌طور بالقوه به روشی قوی و کاربردی برای تشخیص SNPs در دو ژن *Pfcr1* و *pfmdr1* پلاسمودیوم فالسی‌پاروم دست یافت. این روش در یک سیستم کاملاً بسته انجام شده و نمونه‌ها بدون آلودگی قابل استفاده برای انجام روش‌های دیگر هستند. در این روش برای خواندن نتایج به الکتروفورس پس از PCR نیازی نیست بنابراین نتایج سریع‌تر خوانده می‌شود و خطر آلودگی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) نیز وجود ندارد. علاوه بر این با وجود این روش نیازی به تعیین توالی نیست. امروزه برای

منفی (کنترل منفی دارای DNA انسانی به‌عنوان الگو و کنترل منفی فاقد DNA الگو (No Template Control: NTC)) در کنار سایر نمونه‌ها قرار داده شد. به‌منظور بررسی قابلیت تکرارپذیری روش، سویه‌های مرجع و نمونه‌ها هر کدام چهار بار با Light Cycler آزمایش و دمای ذوب آن‌ها تعیین شد. نتایج به‌صورت میانگین دمای ذوب \pm دو برابر انحراف معیار (2SD) نشان داده شد.

۳- نتایج

پروب‌های دورگه‌سازی و تکنولوژی Light Cycler برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های *pfcr1* و *pfmdr1* در مقایسه با سه سویه مرجع ارزیابی شدند. DNA این سویه‌ها با آغازگرهای اختصاصی برای ژن *pfcr1* و *pfmdr1* تکثیر شدند و تجزیه و تحلیل منحنی دمای ذوب هم انجام شد. طبق نتایج جدول ۱، در کدون ۸۶ تعداد ۶ نمونه (۲۳ درصد) از مجموع ۲۶ نمونه مورد مطالعه جهش مشاهده شد. گرچه این جهش در سال اول مطالعه، دیده نشد ولی در سال دوم قابل ملاحظه بود.

جدول ۱ فراوانی جهش‌های *pfmdr1* در میان ۲۶ نمونه خون افراد آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین در چابهار

نمونه‌ها	کدون‌ها			
	۱۲۴۶، ۱۰۴۲، ۱۰۳۴، ۱۸۴	۸۶		
کل نمونه‌ها (تعداد=۲۶)	جهش نیافته (تعداد)	جهش یافته (تعداد)	جهش نیافته (تعداد)	جهش یافته (تعداد)
سال اول نمونه‌گیری (تعداد=۷)	۲۶ (۱۰۰)	۰ (۰)	۲۰ (۷۷)	۶ (۲۳)
سال دوم نمونه‌گیری (تعداد=۱۹)	۷ (۱۰۰)	۰ (۰)	۷ (۱۰۰)	۰ (۰)
	۱۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۱۳ (۶۸/۵)	۶ (۳۱/۵)

طبق نتایج جدول ۲، جهش K76T در هاپلو تیپ CVMNT ژن *pfcr1* در (۴۲/۳ درصد) ۱۱ نمونه و هاپلو تیپ‌های CVIET ۷ (۲۶/۹ درصد) نمونه، و SVMNT در ۵ نمونه (۱۹/۲ درصد) مشاهده شد. این جهش تنها در یک نمونه (۳/۸ درصد) در

نمونه SVIET نشان دادند. از ۲۶ نمونه مورد آزمایش فقط یکی از نمونه‌ها جهش ۷۶ را نداشت با این حال این نمونه در ژن *pfmdr1* جهش N86Y را نشان داد.

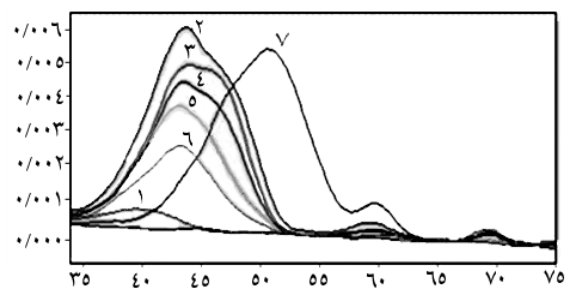
در هر دو سال در هیچ‌کدام از نمونه‌ها در جایگاه اسیدهای آمینه ۱۸۴، ۱۰۳۴، ۱۰۴۲ و ۱۲۴۶ ژن *pfmdr1* جهشی مشاهده نشد. در مطالعه یورسین (Ursin) و همکاران (۲۰۰۶) نیز که با استفاده از روش PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment length polymorphism) در منطقه چابهار انجام شده بود، جهشی در جایگاه‌های اسیدهای آمینه کدون‌های ۱۸۴، ۱۰۳۴، ۱۰۴۲ و ۱۲۴۶ یافت نشد. در مطالعه یورسین و همکاران (۲۰۰۶) حذف اسید آمینه جایگاه ۷۵ گزارش شده و همچنین ال‌های جهش‌یافته جایگاه‌های ۷۴، ۷۵ و ۷۶ توأمآ گزارش نشده است [۶]. در مطالعه اسماعیلی (Esmaeili) و همکاران (۲۰۰۷) که در منطقه سرباز استان سیستان و بلوچستان انجام شده و از روش Nested-PCR استفاده نموده است جهش K76T را در ژن *pfcr1* به میزان بسیار بالا (۹۳/۷۵ درصد) گزارش نموده است [۷].

در سایر مطالعاتی که در دیگر نقاط دنیا بر موارد مقاوم به کلروکین انجام شده دو هاپلوتیپ CVIET و SVMNT در ژن *pfcr1* با مقاومت به ۴ آمینوکلینولین‌ها مرتبط شمرده شده است [۹]. هاپلوتیپ‌های ژن *pfcr1* در چابهار، جنوب شرقی ایران، مشابه هاپلوتیپ‌های CVIET در جنوب شرق آسیا و SVMNT در هند است، که تأییدی بر نظریه گسترش جهانی پلاسمودیوم فالسی پاروم مقاوم به کلروکین است.

در این مطالعه جهش K76T در ژن *pfcr1* بیشترین فراوانی را داشت در مطالعاتی که روی چندشکلی‌های ژنی انجام می‌شود، جهش K76T در ژن *pfcr1* به‌عنوان نشانگر (Marker) تشخیصی برای مقاومت به کلروکین مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰]. مطالعاتی که روی ایزوله‌های آفریقا و آسیا و جنوب آمریکا انجام شده نشان می‌دهد که جهش T76 تقریباً در تمام نمونه‌های مقاوم به کلروکین وجود دارد [۱۱-۱۳]. مطالعاتی که در هند انجام شده نشان می‌دهد که جهش T76 شیوع بالایی در میان ایزوله‌های بالینی (۹۱ درصد) دارد و تقریباً در تمام نمونه‌هایی که به کلروکین پاسخ نمی‌دهد

تعیین جهش‌های تک نوکلئوتیدی Real-time PCR روش انتخابی محسوب می‌شود [۵].

اغلب مطالعات مولکولی پلاسمودیوم فالسی پاروم مقاوم به کلروکین روی چندشکلی‌های موجود در دو ژن *pfcr1* و *pfmdr1* متمرکز است. ژن *pfcr1* روی کروموزوم ۷ قرار دارد و پروتئین‌های انتقالی غشای واکونل را کد می‌کند. ژن *pfmdr1* روی کروموزوم ۵ قرار دارد و p گلیکوپروتئین هومولوگ ۱ (P-Glycoprotein Homologue 1: PGH1) را کد می‌کند [۵].



شکل ۱ منحنی‌های تجزیه و تحلیل دمای ذوب نمونه‌های خون آلوده به پلاسمودیوم فالسی پاروم مقاوم به کلروکین در چابهار و سویه‌های مرجع برای تشخیص جهش K76T ژن *pfcr1*. به‌ترتیب: از چپ به راست: ۱- منحنی 3D7 (سویه حساس)، ۲-۶ منحنی 7G8 (سویه مقاوم) و پنج نمونه حاوی جهش K76T و ۷- منحنی W2 (سویه مقاوم)

در ۷ نمونه مقاومی که در سال اول جمع‌آوری شده بودند در هیچ‌کدام از ۵ کدون ژن *Pfmdr1* جهشی مشاهده نشد که این تأییدی است بر مطالعات قبلی که ثابت می‌کند که مقاومت به کلروکین یک پدیده مولتی‌ژنتیک است و انجام مطالعه همزمان بر دو ژن *pfmdr1* و *pfcr1* نتایج بهتری ارائه می‌دهد [۸]؛ از طرفی در این ۷ نمونه، جهش‌های تک نوکلئوتیدی در ژن *pfcr1* مشاهده شد. بدین ترتیب که در ۵ (۷۱/۴ درصد) نمونه جهش در هاپلوتیپ SVMNT، یک نمونه (۱۴/۳ درصد) در هاپلوتیپ CVIET و یک نمونه (۱۴/۳ درصد) در SVMNT دیده شد.

در ۱۹ نمونه مقاومی که در سال دوم جمع‌آوری شده بود، ۶ (۳۱/۵ درصد) نمونه جهش N86Y را در ژن *pfmdr1* نشان دادند و در ژن *pfcr1* ۶ (۳۱/۶ درصد) نمونه در هاپلوتیپ SVMNT، ۶ (۳۱/۶ درصد) نمونه در هاپلوتیپ CVIET و ۴ (۲۱ درصد) نمونه در هاپلوتیپ SVMNT و ۲ (۱۰/۵ درصد)

به‌طور کلی در کشورهای مختلف این جهش‌ها براساس شیوع‌شان و ارتباطشان با مقاومت دارویی می‌توانند به‌عنوان شاخص‌های افتراقی برای تشخیص موارد مقاوم از موارد حساس به کلروکین به‌کار روند. هدف مطالعه حاضر معرفی روشی قوی و کاربردی برای تشخیص این جهش‌ها بود. روش Real-time PCR با استفاده از پروب‌های دورگه‌سازی می‌تواند به‌راحتی برای تعداد زیادی نمونه و به‌طور اختصاصی برای مطالعات مقاومت دارویی در سطح وسیع به‌کار گرفته شود. با توجه به وجود پتانسیل و امکانات انجام این آزمایش در ایران، پایش درمان و تشخیص زودرس مقاومت به داروهای مختلف به‌راحتی قابل انجام است.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دکتر مونبریسون بابت اهدای سویه‌های مرجع پلاسمودیوم فالسی پاروم از فرانسه و از مرکز تحقیقات دانشگاه تربیت مدرس در چابهار بابت همکاری در جمع‌آوری نمونه خون‌های آلوده به پلاسمودیوم فالسی پاروم مقاوم به کلروکین اعلام می‌دارند.

وجود دارد [۱۳]. به‌نظر می‌رسد که چندشکلی‌های ژن *pfprt* ایران و هند با توجه به تشابهی که دارند منشأ یکسانی دارند. نکته قابل توجه این است که در کشورهایی که داروی کلروکین را از برنامه درمانی ضد مالاریا حذف کرده‌اند شیوع جهش K76T نیز در آن کشور کاهش یافته است [۱۴].

از طرفی مطالعاتی که روی SNPs ژن *pfmdr1* انجام شده، نقش مهم جهش N86Y را در مقاومت به کلروکین نشان داده است. در نمونه‌های مقاوم به کلروکین ایزوله‌های پلاسمودیوم فالسی پاروم مالزی، اندونزی، گینه، نیجریه و جنوب صحرائی آفریقا جهش N86Y و شیوع بالای این جهش در ایزوله‌های کامبوج نیز گزارش شده است [۱۵]. اما مطالعاتی که در اوگاندا، لائوس، کامرون، جنوب آفریقا، برزیل و آمازون انجام شده نشان داد که وجود این جهش به تنهایی برای مقاوم شدن به کلروکین کافی نیست [۹، ۱۶-۲۰]. بنابراین مطالعه همزمان جهش‌های دو ژن *pfmdr1* و *pfprt* نتایج بهتری ارائه می‌دهد. مطالعات دیگری نشان داده است که جهش N86Y باعث افزایش حساسیت به مفلوکین (Mefloquine) و آرتیمیسینین (Artemisinin) می‌شود و این مطلب باید در درمان دارویی در مناطق بومی در نظر گرفته شود [۲۱].

۶- منابع

- [1] Azizi F. Epidemiology and control of common diseases in Iran. 1st ed 2001. Tehran Eshtiagh publisher. (Persian)
- [2] Edrissian GH. Anti malaria drugs, malaria treatment and drug prophylaxis and Plasmodium falciparum drug resistance in malaria endemic areas in south and southeast Iran. Drug Treat 1989; 3: 11-20. (Persian)
- [3] Edrisian GH, Nateghpoor M, Afshar A, Sayedzadeh A, Mohsseni GH, Satvat MT, Emadi AM. Monitoring the response of Plasmodium falciparum and P. vivax to antimalarial drugs in the malarious areas in South-east Iran. Arch Im Med 1999; 2(2): 61-6.
- [4] Volkman SK, Hartl DL, Wirth DF, Nielsen KM, Choi M, Batalov S, Zhou Y, Plouffe D, Le Roch KG, Abagyan R, Winzeler EA. Excess polymorphisms in genes for membrane proteins in Plasmodium falciparum. Science 2002; 298(5591): 216-8.
- [5] de Monbrison F, Raynaud D, Latour-Fondanaiche C, Staal A, Favre S, Kaiser K, Peyron F, Picot S. Real-time PCR for chloroquine sensitivity assay and for pfmdr1-

- pfcr1 single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *J Microbiol Methods* 2003; 54(3): 391-401.
- [6] Ursing J, Zakeri S, Gil JP, Björkman A. Quinoline resistance associated polymorphisms in the pfcr1, pfmdr1 and pfmrp genes of *Plasmodium falciparum* in Iran. *Acta Trop* 2006; 97(3): 352-6.
- [7] Esmaeili Rastaghi A, Nateghpoor M, Assmar M, Razavi MR, Kanbara HK, Uemura H, Naddaf SR, Keshavarz HK, Raeisi A, Mohebbi M. Detection of K76T mutation in pfcr1 gene as an applicable genetic marker for prediction of chloroquine resistant falciparum malaria in isolates from an endemic district of Iran. *Ir J Parasitol* 2008; 3 (2):48-56.
- [8] Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AM, Forsyth K, Kemp DJ, Cowman AF. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1990; 345(6272): 255-8.
- [9] Schneider AG, Premji Z, Felger I, Smith T, Abdulla S, Beck HP, Mshinda H. A point mutation in codon 76 of pfcr1 of *P. falciparum* is positively selected for by chloroquine treatment in Tanzania. *Infect Genet Evol* 2002; 1(3): 183-9.
- [10] Mayor AG, Gómez-Olivé X, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda S, Dgedge M, Barreto A, Alonso PL. Prevalence of the k76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcr1) gene and its relation chloroquine resistance in Mozambique. *J Infect Dis* 2001; 183(9): 1413-6.
- [11] Vinyak S, Biswas S, Dev V, Kumar A, Ansari MA, Sharama YD. Prevalence of the K76T mutation in the pfcr1 gene of *Plasmodium falciparum* among chloroquin responders in India. *Acta Trop* 2003; 87:287-93.
- [12] Berry A, Vessière A, Fabre R, Benoit-Vical F, Marchou B, Massip P, Magnaval JF. Pfcr1 K76T mutation and its associations in imported *Plasmodium falciparum* malaria cases. *Infect Genet Evol* 2004; 4(4): 361-4.
- [13] Durrand V, Berry A, Sem R, Glaziou P, Beaudou J, Fandeur T. Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcr1) and their relationship to chloroquine resistance in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 136(2): 273-85.
- [14] Sharma YD. Genetic alteration in drug resistance markers of *Plasmodium falciparum*. *Indian J Med Res* 2005; 121: 13-22.
- [15] Khim N, Bouchier C, Ekala MT, Incardona S, Lim P, Legrand E, Jambou R, Doung S, Puijalon OM, Fandeur T. Countrywide survey shows very high prevalence of *Plasmodium falciparum* multilocus resistance genotypes in Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3147-52.
- [16] Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc Natl Sci U S A* 1991; 88(8): 3382-6.
- [17] Pillai DR, Labbé AC, Vanisaveth V, Hongvongthong B, Pomphida S, Inkathone S, Zhong K, Kain KC. *Plasmodium falciparum* malaria in Laos: chloroquine treatment

- outcome and predictive value of molecular markers. *J Infect Dis* 2001, 183(5): 789–95.
- [18] Warhurst D. New developments: chloroquine-resistance in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Updat* 2001; 4(3): 141-4.
- [19] Vieira PP, das Gracas Alecrim M, da Silva LH, González-Jiménez I, Zalis MG. Analysis of the Pfcrt K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon region of Brazil. *J Infect Dis* 2001; 183(12): 1832–3.
- [20] Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(4): 209–18.
- [21] Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene (pfcrt) and the multidrug resistance Gene pfmdr1. *J Infect Dis* 2001; 183(10):1535-8.

