بررسی جهش‌های ژنتیکی در کدون‌های ۵۷ و ۵۸ ژن دهیدروفولات ردوکتاز پلاسمودیوم ویواکس

دکتر عباس شهبازی [۱] جلال زمان [۲] دکتر محمد اصغرزاده [۳] عادل اسپوتین [۴] سجاد جدی [۲]

[۱] دانشیار گروه انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری [۲] دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز [۲] دانشجوی دکترای پزشکی مولکولی، پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم [۴] دانشجوی دکترای انگل‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

مجله پزشکی هرمزگان سال هفدهم شماره پنجم آذر و دی ۹۲ صفحات ۳۸۳-۳۷۵

چکیده

مقدمه: *استفاده از سولفادوکسین و پیریمتامین (SP) برای درمان مالاریا ویواکس به دلیل حساسیت این انگل به داروی کلروکین در بسیاری از مناطق مالاریاخیز رایج نیست، اما ایزوله‌های پلاسمودیوم ویواکس (P.vivax) به دلیل عفونتهای مختلط با پلاسمودیوم فالسیپاروم در مواجه با SP قرار گرفته‌اند و این امر باعث ظهور جهش‌هایی در ژن پلاسمودیوم ویواکس دی هیدرو فولات ردوکتاز(Pvdhfr) شده است . همانطور که پلاسمودیوم ویواکس، شایع‌ترین گونه از انگل مالاریا انسانی در ایران است، پایش مقاومت دارویی انگل در مقابل این دارو امری ضروری خواهد بود.*

روش کار: *در این مطالعه، ۵۰ نمونه خون از بیماران علامت‌دار از چهار منطقه جغرافیایی مجزا، از جنوب شرق ایران جمع‌آوری شدند. جهش‌های نقطه‌ای در کدونهای ۵۷ و ۵۸ ژن Pvdhfr با روش PCR-RFLP تشخیص داده شدند.*

نتایج: *در موقعیت کدون 58R ژن Pvdhfr، ۱۲٪ از نمونه‌ها دارای جهش بودند ولی در موقعیت کدون F57 این ژن جهشی در نمونه‌ها یافت نشد و در همه نمونه‌های مورد آنالیز، جهش در کدونهای ۵۷ و ۵۸ به صورت توأم مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که انگل پلاسمودیوم ویواکس در ایران تحت فشار ناشی از SP قرار گرفته است و سطح حساسیت انگل به SP در حال کاهش است که این امر می‌تواند باعث ظهور جهش‌های مؤثر در افزایش مقاومت دارویی شود. بنابراین این واقعیت باید در توسعه برنامه کنترل مالاریا در نظر گرفته شده است.*

کلیدواژه‌ها: *پلاسمودیوم ویواکس – سولفادوکسین – پریمتامین – دهیدرومولات ردوکتاز – مقاومت دارویی*

نویسنده مسئول:
جلال زمان
پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم
دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
تهران – ایران
تلفن: ۰۹۸ ۹۱۴ ۱۴۸ ۳۶۰۳+
پست الکترونیکی:
jalal.jn@gmail.com

دریافت مقاله: ۹۱/۲/۲۹ اصلاح نهایی: ۹۱/۷/۸ پذیرش مقاله: ۹۱/۷/۱۹

مقدمه:

انگل پلاسمودیوم ویواکس گسترده‌ترین نوع مالاریا در نواحی خارج از آفریقا است (۱،۲). کشور ایران در منطقه خاورمیانه واقع شده است و در این منطقه P.vivax بیشترین گونه شایع انگل مالاریا است، که مسئول ۹۰٪-۸۰ از موارد مالاریا می‌باشد. بیماری در ایران در مرزهای جنوب شرقی با پاکستان و افغانستان اندمیک است (۳). پلاسمودیوم ویواکس گسترده‌ترین نوع در بین گونه‌های پلاسمودیوم می‌باشد که موجب ابتلا به بیماری مالاریا می‌شود و سالیانه مسئول حدود ۸۰ میلیون موارد بالینی در جهان می‌باشد (۲). علی‌رغم داشتن مرگ و میر کمتر نسبت به پلاسمودیوم فالسیپاروم (P.falciparum)، این انگل بروز بیشتری را در بین کشورهای اندمیک کمتر توسعه یافته دارد (٤). انتقال مالاریا اغلب در بخش‌های جنوب شرقی کشور اتفاق می‌افتد، مقاومت پلاسمودیوم فالسیپاروم به کلروکین (CQ) از وقتی که اولین مقاومت در استان سیستان بلوچستان در سال ۱۹۸۳ و بعداً در استان هرمزگان در سال ۱۹۸٦ گزارش شد، رو به افزایش است (۵) و کلاً مسئول بیش از ۷۸/۵٪ نقص‌های درمانی در استانهای جنوبی ایران است (٦). در ایران کلروکین به عنوان خط اول

درمانی ضد مالاریا و سولفادوکسین - پریمتامین (SP) به عنوان خط دوم درمانی مالاریا (۷) برای عفونت پلاسمودیوم فالسیپاروم بدون عارضه استفاده می‌شود. با گسترش مقاومت کلروکین در P.falciparum، مرکز مدیریت و کنترل بیماریها (CDMC) در سال ۲۰۰۵ تصمیم گرفت تا در سیاست درمانی مالاریا تجدید نظر کند و SP در ترکیب با CQ به عنوان خط اول درمان مالاریایی و در ترکیب با آرتمیزینین (CO-Artem®) به عنوان خط دوم درمانی معرفی شد (۷). استفاده از داروی SP برای درمان مالاریای پلاسمودیوم ویواکس در اغلب نواحی مالاریا خیز رایج نیست، اما ایزوله‌های پلاسمودیوم ویواکس به دلیل وجود عفونتهای مختلط با پلاسمودیوم فالسپاروم با SP مواجه هستند (۱۰-۸). داروی پریمتامین آنالوگ دی هیدروفولات است که دی هیدروفولات ردوکتاز (DHFR) را مهار می‌کند. مهار اختصاصی دومن DHFR آنزیم بوسیله پریمتامین بیوسنتز پریمیدین را بلوک می‌کند که منجر به مهار همانند سازی DNA می‌شود (۱۱). موتاسیون‌های نقطه‌ای در ژن پلاسمودیوم فالسیپاروم دی هیدروفولات ردوکتاز (Pfdhfr) شناخته شده‌اند که باعث افزایش مقاومت به پریمتامین می‌شوند. در P.falciparum اولین موتاسیون در کدون S108N اتفاق می‌افتد که در آن به جای سرین، آسپارژین جایگزین می‌شود (۱۲). موتاسیونها می‌توانند یک، دو، سه و یا چهار نقطه‌ای در ژن Pfdhfr دیده شوند که بستگی به روند ظهور مقاومت انگل بر ضد دارو دارد. (۱۲). داروی آنتی فولات (پریمتامین) همچنین بر روی پلاسمودیوم ویواکس که دارای همان هدف آنزیمی (dhfr) می‌باشد، اثر می‌کند (۹). مقاومت به پریمتامین در ویواکس با دو تا از موتاسیونهای S58R و S117N ژن Pvdhfr همراه است که با موتاسیونهای S59R وS108N ژن Pfdhfr همولوگ هستند (۱۱). مطالعات نشان داده است که در جاهایی که تاریخچه طولانی مصرف SP را دارند، اللهای موتانت از ژن Pvdhfr شایع هستند، ولیکن تایپ وحشی (Wild) ژن P.vdhfr به طور رایج در نواحی با استفاده محدود از SP یافت شده است (۱۵-۱۳،۹).

مطالعات مختلف بر روی انگل P.vivax در نواحی مختلف اندمیک مالاریا مانند تایلند و اندونزی نشان داد که موتاسیونها در کدونهای ۵۷، ۵۸، ٦۱، ۱۱۷ و ۱۷۳ ژن Pvdhfr (۱٤،۱٦) وجود دارد که در مقاومت بالینی آنتی فولات نقش دارند (۱۳،۱٦). درجه مقاومت به پریمتامین در P.vivax همچنین با اضافه شدن پی در پی هر موتاسیون در ژن DHFR افزایش می‌یابد (۱٤،۱۷،۱۸).

مطالعات نشان داده‌اند که موتاسیونهای سه نقطه‌ای در ژن Pvdhfr (57L+58R+117T) ۲۷۰ برابر مقاومت به پریمتامین را نشان داده‌اند و موتاسیون دو نقطه‌ای در کدون ۵۷ و ۵۸ این ژن تأثیر به سزایی در بروز مقاومت به این دارو دارد (۱۷). بر این اساس ردیابی موتاسیونهای ظهور یافته در ژن DHFR پلاسمودیوم ویواکس برای ارزیابی و پایش مقاومت دارویی این انگل امری ضروری به نظر می‌رسد و در این مطالعه ما ردیابی وجود موتاسیونهای واقع در کدونهای ۵۷ و ۵۸ در ژن P.vdhfr که می‌تواند ناشی از فشار دارویی SP در مناطق اندمیک ایران باشد، با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام خواهیم داد.

روش کار:

در این مطالعه مقطعی، نمونه خون ۵۰ بیمار مبتلا که از عفونت به پلاسمودیوم ویواکس رنج می‌بردند، از ٤ منطقه جغرافیایی، استانهای سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان و استان بوشهر که به مراکز بهداشتی درمانی مراجعه نموده بودند، به صورت تصادفی در طی سالهای ۸۹-۸۸ جمع‌آوری شدند. جمع‌آوری نمونه‌ها توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز به تصویب رسید و پس از اخذ رضایت آگاهانه از افراد مورد مطالعه انجام پذیرفت. مقدار ۱ میلی‌لیتر از خون وریدی بیماران مالاریایی مبتلا به پلاسمودیوم ویواکس، که ابتلای آنها با روش تشخیص میکروسکوپی مسجل شده بود، وارد تیوبهای حاوی EDTA گردید و در C ° 20- ذخیره شده و سپس جهت انجام تست‌های مولکولی به آزمایشگاه بیولوژی مولکولی در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز منتقل گردیدند.

استخراج DNA و انجام PCR:

DNA از خون بیماران توسط کیت Q1Amp® (Qiagen)، مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. غربالگری نمونه‌ها توسط تکنیک Nested-PCR در جهت تشخیص صحیح گونه پلاسمودیوم ویواکس و عدم وجود گونه

فالسیپاروم با بکارگیری از پرایمرهای خاص دوگانه انجام گردیده تا این اطمینان حاصل گردد که نمونه‌ها فقط حاوی پلاسمودیوم و ویواکس می‌باشند. پرایمرهای بکار برده شده جهت تکثیر DNA به روش Nested-PCR در جدول شماره ۱ توصیف شده است. به این صورت که در مرحله اول PCR پرایمرهای rPLU5 و rPLU6 و در مرحله دوم جهت تشخیص گونه پلاسمودیوم ویواکس از پرایمرهای rVIV1 و rVIV2 و برای تشخیص گونه پلاسمودیوم فالسیپاروم از پرایمرهای rFLA1 و rFLA2 استفاده شد (۱۹). شرایط دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر قطعات مورد نظر به صورت واکنش اولیه در ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه در یک سیکل، ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ٦۰ ثانیه، ٥٦ درجه سانتیگراد به مدت و ٦۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲/٥ دقیقه در ۳۰ سیکل و در آخر به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه استفاده شد. برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای در کدونهای ٥۷، ٥۸ که قبلاً شرح داده شد، نمونه‌ها تحت فرآیند روش PCR-RFLP با تغییرات اصلاح شده مورد آنالیز قرار گرفتند (۱٤،۱۳).

تکثیر قطعه‌ای از ژن P.vivaxdhfr توسط PCR برای کدون ٥۷:

در این مرحله قطعه‌ای به اندازه ٦۱۱ جفت باز از ۷۱۱ جفت باز ژن Pvdhfr با استفاده از پرایمرهای VDT-OF و VDT-NR، (۱۳) جهت ردیابی موتاسیون در کدون F57I/L در تمام نمونه‌ها مورد تکثیر قرار گرفت (جدول شماره ۲). شرایط تکثیر برای این مرحله به این صورت است: واسرشتگی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه سپس ۳٥ چرخه واسرشتگی در دمای ۹٤ به مدت ٥۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦٦ درجه سانتیگراد به مدت ٥۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٦٥ ثانیه و نهایتاً تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه.

RFLP برای موقعیت کدون ٥۷:

برای تشخیص وجود و یا عدم وجود موتاسیون در کدون F57I/L، حدود ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR (٦۱۱جفت باز) با 10U آنزیم محدودالاثر Xmn I (فرمنتاز) برای مدت ۱٥ ساعت در دمای ۳۷ درجه در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر هضم شدند. آنزیم XmnI در موقعیت کدون ٥۷ ژن با ایجاد برش آنزیمی در قطعه ٦۱۱ جفت باز می‌تواند منجر به ایجاد قطعات ٤٤٥ و ۱٦٦ جفت باز گردد که نشان‌دهنده عدم وجود جهش در این کدون می‌باشد (شکل ۱).

تکثیر قطعه‌ای از ژن P.vivaxdhfr توسط PCR برای کدون ٥۸:

در این مرحله، قطعه‌ای به اندازه ۲۳۸ جفت باز از ۷۱۱ جفت باز ژن Pvdhfr با استفاده از پرایمرهای VDT-OF و VDF-NR58، (۱۳،۱٤) جهت ردیابی موتاسیون در کدون S58R در تمام نمونه‌ها مورد تکثیر قرار گرفت (جدول شماره ۲). شرایط تکثیر برای این مرحله به این صورت است: واسرشتگی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه سپس ۳٥ چرخه واسرشتگی در دمای ۹٤ به مدت ٥۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦٦ درجه سانتیگراد به مدت ٥۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٦۰ ثانیه و نهایتاً تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه.

RFLP برای موقعیت کدون ٥۸:

برای تشخیص وجود یا عدم وجود موتاسیون در کدون S58R، حدود ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR (۲۳۸جفت باز) با 10U آنزیم محدودالاثر Alu I (فرمنتاز) برای مدت ۱٥ ساعت در دمای ۳۷ درجه در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر هضم شدند. در قطعهء ۲۳۸ جفت باز تکثیر یافته از ژن مربوطه اگر در کدون ٥۸ جهش وجود داشته باشد، آنزیم Alu I دارای یک جایگاه برش و در صورت عدم وجود جهش آنزیم دارای دو جایگاه برش خواهد بود. در نمونه‌های مورد بررسی، در نمونه‌هایی که الگوی RFLP به صورت باندهایی در حدود ۲۱۳ و ۲٥ جفت باز دیده شود این امر نشان دهنده وجود جهش در کدون 58R می‌باشد و در نمونه‌هایی که الگوی RFLP باندهایی در حدود ۱۷۳، ٤۰ و ۲٥ جفت باز را نشان دهد، نشان‌دهنده عدم وجود جهش می‌باشد (شکل ۲).

الکتروفورز محصولات PCR و هضم آنزیمی:

قطعات DNA بدست آمده از تکثیر PCR و فرآیند هضم آنزیمی روی ژل آگاروز ۱/٥٪ (فرمنتاز) حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند و سپس با استفاده از دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت، ژل‌های حاصل مورد عکسبرداری قرار گرفتند (شکلهای ۱ و ۲).

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده شده جهت تشخیص پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم

	نام	توالی پرایمرها
جنس	rPLU5	5'-CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3
پلاسمودیوم	rPLU6	5'- TAA AAA TTG TTG CAG TTA CG-3
گونه	rFLA1	5'- TTA ACC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3
فالسیپاروم	rFLA2	5'- ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3
گونه	rVIV1	5'- CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAA TGA TAC-3
ویواکس	rVIV2	5'- ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3

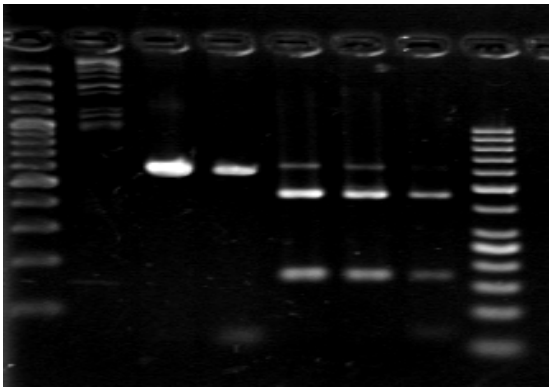
جدول شماره ۲- توالی پرایمرها، شماره دسترسی و قطعات ژنی موردنظر

قطعه ژنی	شماره دسترسی	توالی پرایمرها	پرایمرها
۶۱۱ جفت باز	X98123	5□-ATGGAGGACCTTTCAGATGTATTTGACATT-3□	VDT-OF
		5□-TCACACGGGTAGGCGCCGTTGATCCTCGTG-3□	VDT-NR
۲۳۸ جفت باز	X98123	5□-ATGGAGGACCTTTCAGATGTATTTGACATT-3□	VDT-OF
		5□-GGTACCTCTCCCTCTTCCACTTTAGCTTCT-3□	VDT-NR58

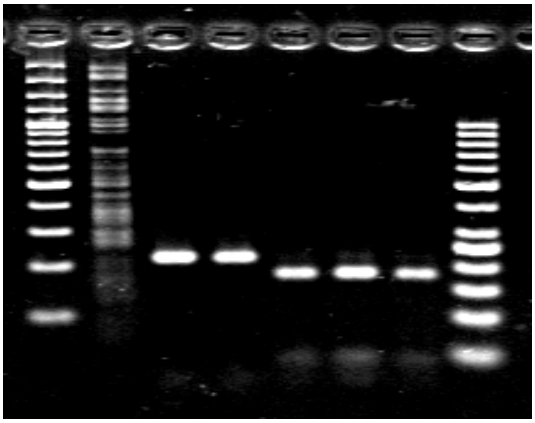
نتایج:

تمام ۵۰ نمونه گرفته شده از نواحی اندمیک جنوبی ایران برای ردیابی وجود جهش در کدون‌های ۵۷ و ۵۸ در ژن *Pvdhfr* با استفاده از روش PCR-RFLP مورد آنالیز مولکولی قرار گرفتند. در همه نمونه‌های مورد آنالیز از ٤ استان اندمیک مذکور، در کدون ۵۷ هیچ موتاسیونی یافت نشد. به عبارتی کدون مربوطه، شامل اسید امینه فنیل آلانین می‌باشد و این نشان می‌دهد که تمام نمونه‌ها در این کدون (۵۷)، وحشی (wild) می‌باشند (جدول شماره ۳). اما از تمام نمونه‌های مورد بررسی برای ردیابی وجود موتاسیون در کدون ۵۸ در ٦ نمونه، الگوی RFLP نشانگر وجود جهش در این کدون بود. به این ترتیب در ۱۲٪ از نمونه‌ها در کدون ۵۸ موتاسیون یافت شد که نشان‌دهنده این است که در این نمونه‌ها جانشینی کدون آرژنین به جای کدون سرین اتفاق افتاده است. در حالی که در ۸۸٪ از نمونه‌ها در همین کدون موتاسیون نداشتند و به صورت وحشی (Wild) بودند.

از لحاظ بررسی موقعیت جغرافیایی در نمونه‌های اخذ شده از استانهای سیستان و بلوچستان، هرمزگان، بوشهر و استان کرمان به صورت جداگانه، در کدون ۵۸ به ترتیب ۸٤/٦ ، ۱۰۰، ۹۲/۳ و ۷۲/۷ درصد از نمونه‌های این استانها به صورت وحشی (فاقد جهش) بودند ولی در همین کدون به ترتیب ۱۵/٤، ۰، ۷/۷ و ۲۷/۳ درصد از نمونه‌ها دارای جهش از نوع جانشینی آرژنین بودند (جدول شماره ۳). لذا براساس این نتایج از لحاظ جغرافیایی به نظر می‌رسد که در استانهای اندمیک ما انگل ویواکس در معرض جهش‌های ژنتیکی در ژن P.VDHFR قرار دارد. باندهای ایجاد شده بوسیله آنزیم‌های مربوطه به طور کلی موافق با جایگاههای برش آنزیمی در ژن X98123 بودند (۱٤،۱۳).



شکل ۱- باندهای مربوط به الکتروفورز RFLP محصول PCR (٦۱۱ جفت باز) با آنزیم Xmn I برای ردیابی جهش در کدون 57 ردیف ۱، سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ ردیف ۲، برش DNA لامبدا با آنزیم؛ ردیف ٤و۳، محصول PCR، ٦۱۱ جفت باز ؛ ردیف ۵ تا ۷، باندهای ٤٤۵ جفت باز و ۱٦٦ جفت باز؛ ردیف ۸، سایز مارکر ۵۰ جفت باز



شکل ۲- باندهای مربوط به الکتروفورز RFLP محصول PCR (۲۳۸ جفت باز) با آنزیم Alu I برای ردیابی وجود جهش در کدون 58. ردیف ۱، سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ ردیف۲، برش DNA لامبدا با آنزیم؛ ردیف ۳و۴، باند ۲۱۳ جفت باز (نشانگر وجود جهش در کدون 58R)؛ ردیف ۵،۶ و۷، باند ۱۷۳ جفت باز؛ ردیف ۸ سایز مارکر ۵۰ جفت باز

جدول شماره ۳- توزیع جهش‌ها در دو کدون از ژن DHFR ایزوله‌های پلاسمودیوم ویواکس در استانهای جنوبی کشور و ایران

استانهای جنوبی کشور (تعداد نمونه)	F57L(%,n)	S58R(%,n)
سیستان و بلوچستان (۱۳)	F (٪۱۰۰) ۵۰	S(٪۸٤/٦) ۱۱ / **R**(٪۱۵/٤) ۲
هرمزگان (۱۳)	F (٪۱۰۰) ۵۰	S (٪۱۰۰) ۱۳
بوشهر (۱۳)	F (٪۱۰۰) ۵۰	S (٪۹۲/۳)۱۲ / **R** (٪۷/۷)۱
کرمان (۱۱)	F (٪۱۰۰) ۵۰	S(٪۷۲/۷)۱۱ / **R** (٪۲۷/۳)۳
کل مناطق اندمیک (۵۰)	F (٪۱۰۰) ۵۰	S (٪۸۸) ٤٤ / **R** (٪۱۲) ٦

اسید آمینه‌های مربوط به کدون جهش یافته به صورت Bold می‌باشند. :F فنیل آلانین S: سرین R: آرژنین n: نمونه

بحث و نتیجه‌گیری:

در سالهای اخیر از لحاظ اقتصادی ٤ استان اندمیک ذکر شده، خسارتهای قابل توجهی را در طول اپیدمی‌های مالاریا متحمل شده‌اند، با این حال فعالیتهای کنترلی مالاریا باعث ایجاد هزینه‌های سنگین برنامه‌های اقتصادی- اجتماعی شده است (۲۰). بنابراین تحقیقات بیشتر روی تمام جوانب این انگل به خصوص در زمینه مقاومت دارویی این انگل امری بسیار ضروری به نظر می‌رسد. از سال ۲۰۰۵ با توجه به سیاست دارویی ملی، درمان بر علیه انگل مالاریا در ایران تغییر کرد و SP به عنوان خط اول درمان دارویی بر علیه مالاریای فالسیپاروم انتخاب شد. با دسترسی هرچه بیشتر این دارو و ارزان بودن تهیه آن و گسترش عفونتهای مختلط پلاسمودیوم ویواکس و فالسیپاروم در نواحی اندمیک مالاریا، خطر تغییر الگوی مقاومت به SP در انگل ویواکس، این مناطق را تهدید می‌کند (١٦). از این رو به خاطر عدم وجود روشهای کارا و مؤثر برای ارزیابی‌های in vitro و in vivo مقاومت دارویی پلاسمودیوم ویواکس، نیاز به روشهای کاربردی دیگر مانند بکارگیری روشهای مولکولی برای ردیابی جهش‌ها و ارزیابی مقاومت دارویی پلاسمودیوم ویواکس در حال افزایش است (۲۱). در این مطالعه، ما از روش حساس PCR-RFLP برای ردیابی موتاسیونهای ژن Pvdhfr که مرتبط با مقاومت به پریمتامین هستند، استفاده

شد. در نواحی مالاریاخیز SP می‌تواند باعث ایجاد فشار دارویی ناشی از مصرف این دارو بر پلاسمودیوم ویواکس شود که می‌تواند به صورت ناخواسته در اثر مصرف این دارو که بر علیه مالاریای فالسیپاروم استفاده می‌شود، قرار گیرد (۱۳،۱٤،۲۲). اگرچه پلاسمودیوم ویواکس در جنوب ایران به داروی کلروکین حساس باقی مانده است ولی گزارشاتی از سال ۲۰۰۱ مبنی بر کاهش حساسیت انگل به دارو و افزایش زمان کلیرانس انگل شده است (۸). بنابراین داروهای مؤثر بر ضد انگل‌های مقاوم مورد نیاز می‌باشد. ارتباط ما بین افزایش جهش‌های نقطه‌ای و کاهش حساسیت انگل به داروی پریمتامین در بیان اللهای مختلف در مخمر ثابت شده است. به طور کلی با افزایش تعداد موتاسیونهای نقطه‌ای مقاومت به پریمتامین افزایش می‌یابد (۲۲،۸). اگرچه در این مطالعه جهش دو نقطه‌ای (کدون ۵۷، ۵۸ به صورت توأم) در بین ۵۰ نمونه مورد آزمایش مشاهده نشد، ولی در کدون ۵۸ در ۱۲٪ (٦ مورد) از نمونه‌ها جهش مشاهده گردید، در واقع به علت عدم ردیابی جهش در کدون ۵۷، فقط جهش یک نقطه‌ای در کدون ۵۸ مشاهده شد که البته کمتر از گزارش ذاکری و همکاران (با توجه به نمونه‌های بیشتر این مطالعه) که به میزان ۲۱/۷٪ بود، می‌باشد (۸). در چنین وضعیتی با توجه به گزارش ذاکری و همکاران مبنی بر وجود جهش در این ژن و ردیابی جهش در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که گسترش مصرف SP برای درمان مالاریای فالسیپاروم می‌تواند عاملی برای گسترش جهش‌های دو، سه، و چهار نقطه‌ای در کدونهای دیگر از ژن Pvdhfr باشد که باعث افزایش هرچه بیشتر الل‌های موتانت با پتانسیل مقاومت بیشتر نسبت به پریمتامین در انگل ویواکس شود (۸). در صورت گسترش این روند این امر می‌تواند شبیه وضعیتی باشد که در تایلند اتفاق افتاد، آنالیز نمونه‌ها در تایلند، جایی که SP به طور گسترده در گذشته استفاده می‌شد، نشان داد که ۱۰۰٪ نمونه‌ها دارای الل‌های موتانت دونقطه ای (F57L, S58R)، سه نقطه‌ای (S58R, T61M and S117T) و چهار نقطه‌ای (F57I, S58R, T61M, and S117T) می‌باشد (۲۱) و باید از وقوع چنین فاجعه‌ای در کشور ما نیز جلوگیری شود.

داروهای آنتی فولات دیگری مثل کوتریموکسازول در نواحی مالاریاخیز که به طور روتین برای عفونتهای غیرمالاریایی استفاده می‌شود، می‌تواند باعث افزایش فشار دارویی روی انگل پلاسمودیوم ویواکس شده (٤،۸،۲۳)، و منجر به گسترش الل‌های موتانت شود، در نتیجه مطالعه ما نشان می‌دهد که اگرچه کلروکین هنوز داروی مورد استفاده برای درمان مالاریای ویواکس در ایران است اما بنا به دلایلی مانند احتمال عدم تشخیص مالاریا در آزمایشگاههای فیلد، عفونتهای مختلط و به طور قابل توجه عفونتهای وارده از کشورهای افغانستان، پاکستان و هند، انگل تحت فشار دارویی ناشی از SP قرار دارد و سطح حساسیت انگل به دارو در حال کاهش است. از لحاظ نقش کاربردی چنین مطالعه ای و کمک آن برای تعیین پروتکل دارویی برای پلاسمودیوم ویواکس قابل ذکر است که اگر روزی مرکز مدیریت وکنترل بیماریها تصمیم بگیرد که داروی SP بر علیه انگل ویواکس در مبتلایان به این انگل که به کلروکین مقاوم شده‌اند، استفاده شود. باید از هم‌اکنون وضعیت مقاومت به این دارو بررسی شود .لذا بهتر است که ارزیابی ژنتیکی مقاومت دارویی نسبت به SP در نمونه‌های زیاد و سالهای متفاوت انجام شده تا بهتر بتوان نسبت به استفاده احتمالی این دارو در آینده تصمیمات کاربردی گرفت.

از سوی دیگر، پژوهشی ضروری است که امکانات تشخیص مولکولی ساده، ارزان و با دقت بیشتر مثل PCR-RFLP در آزمایشگاههای مناطق اندمیک هر چه سریعتر راه اندازی شده و مورد استفاده قرار گیرد. در نتیجه می‌توان گفت که به علت اینکه داروی SP فعلاً برای پلاسمودیوم ویواکس استفاده نمی‌شود و ما نمی‌توانیم از نوع درمان، طول درمان و نوع داروی مصرف شده صحبت کنیم و به طور کلی نوع اطلاعات درمانی بیماران و نوع داروها و به خصوص طول بهبود بیماری در خصوص مصرف این دارو را نیز در اختیار نداریم، چنین آزمایشات تشخیص مولکولی پیش از موعد در ردیابی جهش‌های عامل مقاومت دارویی در انگل‌هایی که به طور ناخواسته و یا به علت اشتباهات تشخیصی ذکر شده در مواجهه با آنتی‌فولات‌ها قرار گرفته‌اند و باعث بروز جهش در ژن P.vdhfr شده‌اند، امری کاملاً ضروری و اساسی است. در غیر این صورت چنین عواملی می‌تواند آینده این انگل را در صورت قرار گرفتن داروی SP در خط اول درمانی بر علیه ویواکس با خطر مواجه سازد. این آزمایشات زنگ خطری است که می‌تواند از بروز مقاومت دارویی این انگل در سطح کشور به علت مسائل

گفته شده خبر دهد و نشان می‌دهد که در توسعه برنامه‌هایی کنترل مالاریا در ایران باید این خطرات تهدیدکننده در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری:

این مقاله از رساله دوره کارشناسی ارشد نویسنده دوم مقاله، طی سالهای ۱۳۸۹-۱۳۸۷ با کمک مرکز عفونی - گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز تأمین شده است، بدینوسیله از زحمات این مرکز در انجام این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

References منابع

1. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of Plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64:97-106.
2. Schousboe ML, Rajakaruna RS, Salanti A, Hapuarachchi HC, Galappaththy GN, Bygbjerg IC, et al. Island-wide diversity in single nucleotide polymerphisms of the Plasmodium vivax dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes in Sri Lanka. *Malar J*. 2007;6:28.
3. Shahbazi A, Raeisi A, Nateghpour M, Mirhendi H, Mohebali M, Asmar M. Polymorphism of merozoite surface protein-3α gene of Plasmodium vivax in isolates of Iran. *Iran J Parasitol*. 2008;3:15-20.
4. Auliff A, Wilson DW, Russell B, Gao Q, Chen N, Anh le N, et al. Amino acid mutations in Plasmodium vivax DHFR and DHPS from several geographical regions and susceptibility to antifolate drugs. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75: 617-621.
5. Zakeri S, Afsharpad M, Raeisi A, Dinparast ND. Prevalence of mutations associated with antimalarial drugs in Plasmodium falciparum isolates prior to the introduction of sulphadoxine-pyrimethamine as first-line treatment in Iran. *Malar J*. 2007;6:148.
6. Raeisi A, Ringwald P, Safa O, Shahbazi A, Ranjbar M, Keshavarze H, et al. Monitoring of the therapeutic efficacy of chloroquine for the treatment of uncomplicated, Plasmodium falciparum malaria in Iran. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006;100:11-16.
7. Zakeri S, Mehrizi AA, Mamaghani S, Noorizadeh S, Snounou G, Djadid ND. Population structure analysis of Plasmodium vivax in areas of Iran with different malaria endemicity. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:394-400.
8. Zakeri S, Motmaen SR, Afsharpad M, Djadid ND. Molecular characterization of antifolates resistance-associated genes (dhfr and dhps) in Plasmodium vivax isolates from the Middle East. *Malar J*. 2009;8:20.
9. de Pécoulas PE, Tahar R, Ouatas T, Mazabraud A, Basco LK. Sequence variations in the Plasmodium vivax dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and their relationship with pyrimethamine resistance. *Mol Biochem Parasitol*. 1998;92:265-273.
10. Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A, Djadid ND. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. *Malar J*. 2002;1:20.
11. de Pecoulas PE, Basco LK, Tahar R, Ouatas T, Mazabraud A. Analysis of the Plasmodium vivax dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene sequence. *Gene*. 1998;211:177–185.
12. Gregson A, Plowe CV. Mechanism of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev*. 2005;57:117–145.

13. Imwong M, Pukrittakayamee S, Looareesuwan S, Pasvol G, Poirreiz J, White NJ, et al. Association of genetic mutations in Plasmodium vivax dhfr with resistance to sulphadoxinee-pyrimethamine: geographical and clinical correlates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:3122–3127.

14. Imwong M, Pukrittayakamee S, Rénia L, Letourneur F, Charlieu JP, Leartsakulpanich U, et al.(2003). Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of Plasmodium vivax: evidence for sequential selection by drug pressure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:1514–1521.

15. Tjitra E, Baker J, Suprianto S, Cheng Q, Anstey NM. Therapeutic efficacies of artesunate-sulphadoxinee-pyrimethamine and chloroquine sulphadoxine-pyrimethamine in vivax malaria pilot studies: relationship to Plasmodium vivax dhfr mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3947–3953.

16. Hawkins VN, Joshi H, Rungsihirunrat K, Na-Bangchang K, Sibley CH. Antifolates can have a role in the treatment of Plasmodium vivax. *Trends Parasitol*. 2007;23:213-222.

17. Hastings MD, Porter KM, Maguire JD, Susanti I, Kania W, Bangs MJ, et al. Dihydrofolate reductase mutations in Plasmodium vivax from Indonesia and therapeutic response to sulphadoxinee plus pyrimethamine. *J Infect Dis*. 2004;189:744-750.

18. Hastings MD, Maguire JD, Bangs MJ, Zimmerman PA, Reeder JC, Baird JK, et al. Novel Plasmodium vivax dhfr alleles from the Indonesian Archipelago and Papua New Guinea: association with pyrimethamine resistance determined by a Saccharomyces cerevisiae expression system. Antimicrob. *Agents Chemother*. 2005;49:733-740.

19. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensivity of detection of human malaria parasites by the use of nested Polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;61:315-320.

20. Diseases Management Center of MOH. I.R. Iran. Annual Reports of Malaria; 2006. [Persian]

21. Brega S, de Monbrison F, Severini C, Udomsangpetch R, Sutanto I, Ruckert P, et al. Real-time PCR for dihydrofolate reductase gene single-nucleotide polymorphisms in Plasmodium vivax isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2581-2587.

22. Na BK, Lee HW, Moon SU, In TS, Lin K, Maung M, et al. Genetic variations of the dihydrofolate reductase gene of Plasmodium vivax in Mandalay Division, Myanmar. *Parasitol Res*. 2005;96:321-325.

23. Foote SJ, Cowman AF. The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Trop*. 1994;56:157-171.

Genetic mutations in 57 and 58 codons gene of Plasmodium vivax dihydrofolate reductase

A. Shahbazi, PhD [1] J. Zaman, PhD Student [2] M. Asgharzadeh, PhD [3] A. Spotin, PhD Student [4]
S. Jeddi, PhD Student [2]

Associate Professor Department of Prasitology [1], Infections and Tropical Research Center, Associate Professor Department of Biotechnology [3], Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. PhD Student of Molecular Medicine [2], Research Institute for Endocrine Sciences, PhD Student of Parasitology [4], Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

(Received 18 May, 2012 Accepted 10 Oct, 2012)

ABSTRACT

Introduction: The use of Sulfadoxine and pyrimethamine (SP) for treatment of vivax malaria is not common in most of malarious areas because of sensivity of this parasite to chloroquine. But, *Plasmodium vivax* isolates are exposed to SP because of mixed infection with *P.falciparum* and this subject has lead to emergence of mutations in P.vdhfr gene**.** As *Plasmodium vivax* is the most prevalent species of human malaria parasites in Iran, monitoring of resistance of the parasite against the drug would be necessary.

Methods: In this study, 50 blood samples of symptomatic patients were collected from four separated geographical regions of south-east of Iran. Point mutations at residues 57, 58 were detected by PCR-RFLP method.

Results: Polymorphism at positions 58R, of *Pvdhfr* gene has been found in 12% of isolates and mutation at residue F57 was not detected. Alleles with two points mutations in Pvdhfr gene were not found.

Conclusion: This study showed that *P. vivax* in Iran is under the pressure of SP and the sensitivity level of the parasite to SP determines that this subject can lead to emergence of influence mutations in increase of drug resistance. So, this fact must be considered in development of malaria control program.

Correspondence:
J. Zaman, PhD Student.
Research Institute for Endocrine Science, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.
Tehran, Iran
Tel:+98 914 148 3603
Email:
Jalal.jn@gmail.com

Key words: *Plasmodium Vivax* - Sulfadoxine - Pyrimethamine – Dihydrofolate Reductase - Drug Reresistance