DOI: 10.22122/jims.v38i600.13330 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هشتم/شماره‌ی ۶۰۰/هفته‌ی چهارم دی ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۳ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۱۰/۲۸

فراوانی انواع ژنوتایپ‌های ژن MSP-3α پلاسمودیوم ویواکس در بیماران مبتلا به مالاریا با استفاده از روش Nested Polymerase Chain Reaction

سپیده طلوعی[۱]، سید امیررضا ظهیرمیردامادی[۲]، سیدحسین حجازی[۳]، زهرا غیور نجف‌آبادی[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ژنوتایپ‌های مختلف انگل عامل بیماری مالاریا، باعث افزایش اطلاعات پایه‌ای در مورد انگل می‌شود و می‌تواند راهکار مناسبی برای بالا بردن کنترل و درمان بیماری در آینده باشد. از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی ساختار ژنتیکی پلاسمودیوم ویواکس بر اساس ژن MSP-3a در بیماران مبتلا به مالاریا در اصفهان و بررسی میزان فراوانی انواع ژنوتایپ‌های این انگل انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه، ۴۰ نمونه خون از بیماران مبتلا به مالاریای آلوده به پلاسمودیوم ویواکس که به آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی استان اصفهان مراجعه کردند، جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی بر اساس ژن MSP-3a و روش Nested Polymerase chain reaction (Nested PCR) بررسی شدند.

یافته‌ها: بر اساس اندازه‌ی محصول PCR، سه نوع ژنوتایپ A (در حدود ۱۹۰۰ جفت‌باز)، B (در حدود ۱۶۰۰ جفت‌باز) و C (در حدود ۱۲۰۰ جفت‌باز) از ژن PvMSP-3α مشاهده شد. ژنوتایپ A با ۷۲/۵ درصد، بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص داده بود و در ۱۰ درصد بیماران، هر دو ژنوتایپ A و B همزمان مشاهده شد. میانگین تعداد انگل در میکرولیتر خون نیز در ژنوتایپ‌های مختلف، متفاوت بود.

نتیجه‌گیری: بررسی میزان فراوانی ژن PvMSP-3α به عنوان یک نشانگر ژنتیکی مناسب می‌تواند جهت تشخیص انواع ژنوتایپ‌های پلاسمودیوم ویواکس و تعیین عفونت‌های همزمان مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، میزان پارازیتمی متفاوت در ژنوتایپ‌های مختلف، ممکن است نمایانگر متفاوت بودن الگوی عود، علایم بیماری، طول مدت عفونت، پاسخ ایمنی و مقاومت در ژنوتایپ‌های مختلف باشد و در تحقیقات تهیه‌ی واکسن به پژوهشگران کمک کند.

واژگان کلیدی: مالاریا؛ ژنوتایپ؛ پلاسمودیوم ویواکس؛ Polymerase chain reaction

ارجاع: طلوعی سپیده، ظهیرمیردامادی سید امیررضا، حجازی سیدحسین، غیور نجف‌آبادی زهرا. **فراوانی انواع ژنوتایپ‌های ژن MSP-3α پلاسمودیوم ویواکس در بیماران مبتلا به مالاریا با استفاده از روش Nested Polymerase Chain Reaction.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۶۰۰): ۸۶۱-۸۵۶.

مقدمه

مالاریا یک بیماری انگلی تک یاخته‌ای قدیمی و یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی کشورهای گرمسیر و نیمه گرمسیر جهان با میزان ابتلا و مرگ و میر بالا می‌باشد (۱). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، در سال ۲۰۱۹ میزان بروز بیماری به طور تقریبی ۲۲۸ میلیون نفر و میزان مرگ و میر ۴۰۵۰۰۰ نفر تخمین زده شد (۲). اگر چه میزان مرگ و میر نسبت به سال‌های قبل کاهش داشته است، اما این میزان مرگ و میر برای بیماری مالاریا، هنوز بالا می‌باشد (۱).

اگر چه وخیم‌ترین و کشنده‌ترین مالاریا ناشی از پلاسمودیوم فالسیپاروم می‌باشد، اما شایع‌ترین فرم بیماری مربوط به پلاسمودیوم ویواکس است که بیش از ۸۰ درصد موارد مالاریای جهان و ایران توسط آن ایجاد می‌گردد (۳). اگر چه در بیشتر مناطق مالاریاخیز، مقاومت پلاسمودیوم فالسیپاروم نسبت به کلروکین دیده شده است، اما در مواردی مقاومت دارویی پلاسمودیوم ویواکس نیز گزارش شده و در حال افزایش است (۴). تاکنون مطالعات مولکولی زیادی جهت بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ژنوتایپ‌های مختلف انگل انجام شده است که این مطالعات، از یک سو می‌توانند اطلاعات پایه‌ای در

۱- استادیار، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: زهرا غیور نجف‌آبادی؛ استادیار، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: ghayour@med.mui.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مورد ریخت‌شناسی انگل، الگوهای عود، علایم بیماری، طول مدت عفونت، پاسخ ایمنی، مقاومت و انتقال توسط پشه‌ی آنوفل به ما بدهد و از سوی دیگر، می‌تواند منجر به تبیین راهکاری مناسب برای بالا بردن کنترل و درمان بیماری در آینده باشد (۶-۵).

در سال‌های اخیر، برای بررسی ساختار ژنتیکی پلاسمودیوم ویواکس، از ژن‌های پلی‌مورفیسم متعدد مانند پروتئین‌های سطحی مروزوئیت‌ها Merozoite surface proteins (MSP) استفاده شده است تا تنوع و فراوانی ژنوتایپ ایزوله‌ها از نواحی مختلف جغرافیایی مورد ارزیابی قرار گیرد (۷). با وجود این که ایران جزء مناطق اندمیک مالاریا با بار کم بیماری محسوب می‌شود و از برنامه‌ی کنترلی مؤثر و موفقی نیز برخوردار است، اما هنوز انتقال محلی بیماری در برخی استان‌های کشور مانند سیستان بلوچستان، هرمزگان و کرمان گزارش می‌شود (۸).

تاکنون چندین تحقیق بر روی ساختمان ژنتیکی پلاسمودیوم ویواکس با استفاده از MSP-3α در مناطق مالاریاخیز ایران انجام شده است و اطلاعاتی نیز از تنوع ژنتیکی آن به دست آمده است (۱۱-۹)، اما همچنان اطلاعاتی از تنوع ژنتیکی این انگل در مناطق و استان‌هایی که مالاریای وارده (Imported malaria) در آن گزارش شده است، در دسترس نمی‌باشد.

با توجه به این که بیشتر موارد بیماری مالاریا در اصفهان از نوع وارده (بیشتر موارد از اتباع خارجی افغانستان و پاکستان) می‌باشد، هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، بررسی ساختار ژنتیکی و تعیین میزان فراوانی انواع ژنوتایپ‌های پلاسمودیوم ویواکس بر اساس ژن MSP-3a در بیماران مبتلا به مالاریا در این شهرستان بود تا با شناخت الگوی ژنتیکی مالاریای وارده، شاید بتوان از آن در برنامه‌های اپیدمیولوژیک و طراحی واکسن استفاده کرد. همچنین، با توجه به این که محاسبه‌ی کمی انگل در خون برای تشخیص موارد شدید بیماری، پیش‌آگهی آن، کنترل و نظارت پاسخ‌دهی بر درمان ضرورت دارد، ارتباط احتمالی بین تعداد انگل در میکرولیتر خون و تنوع ژنتیکی نیز بررسی شد.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و تعیین پارازیتمی: تحقیق حاضر، از نوع مطالعات مقطعی می‌باشد. در این مطالعه، در طول سال ۱۳۹۶، ۴۰ نمونه‌ی استفاده شده از افراد تب‌دار مشکوک به مالاریا که به آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی استان اصفهان مراجعه کردند، به دست آمد. یک لام گسترش نازک و ضخیم از خون محیطی بیماران تهیه و پس از این که با کمک میکروسکوپ ابتلا به مالاریای ناشی از پلاسمودیوم ویواکس آن‌ها ثابت شد، جهت انجام آزمایش‌های مولکولی یک سی‌سی نمونه‌ی خون از بیمارگرفته شد. این مطالعه با کد اخلاق IR.MUI.REC. 1396.3.594 به ثبت رسید و قبل از نمونه‌گیری، توضیحات کافی در ارتباط با هدف مطالعه و روش اجرا به داوطلبین شرکت در مطالعه داده شد و فرم رضایت‌نامه توسط بیمار امضا شد. همچنین، مشخصات افراد حاضر در مطالعه، در پرسش‌نامه‌ای که به این منظور تهیه و طراحی شده بود، ثبت گردید. نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) جمع‌آوری شد و بر روی یخ از مراکز نمونه‌گیری به آزمایشگاه تحقیقاتی گروه انگل و قارچ‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل گردید. سپس، بلافاصله در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر تقسیم‌بندی و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی ژنوتایپ پلاسمودیوم ویواکس به روش Nested PCR (Nested Polymerase chain reaction): ژن PvMSP-3α توانایی تعیین ژنوتایپ‌های پلاسمودیوم ویواکس را بدون نیاز به توالی‌یابی دارد. استخراج DNA به وسیله‌ی کیت استاندارد GeNet Bio (Korea) و بر اساس دستورالعمل آن، انجام شد. سپس، برای تعیین ژنوتایپ پلاسمودیوم ویواکس در نمونه‌های خون، از روش مولکولی Nested PCR با استفاده از پرایمرهای ژن PvMSP-3α که در موقعیت‌های ۱۳۰-۱۱۱ و ۲۳۰۵-۲۲۸۶ (PCR اولیه) و موقعیت‌های ۲۲۷-۲۰۵ و ۲۱۰۰-۲۰۷۸ (PCR ثانویه) طراحی شده توسط Bruce و همکاران استفاده شد (۱۲) (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرها مورد استفاده (۱۲)

	پرایمرها	توالی ′۳-′۵
PCR اولیه	P1	CAGCAGACACCATTTAAGG
	P2	CCGTTTGTTGATTAGTTGC
PCR ثانویه	N1	GACCAGTGTGATACCATTAAC
	N2	ATACTGGTTCTTCGTCTTCAGG

PCR: Polymerase chain reaction

روش PCR جهت تکثیر DNA به وسیله‌ی ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (BIO RAD T100) و با برنامه‌ی دمایی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه و به دنبال آن، مراحل جدا شدن به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و طویل شدن به مدت ۲/۵ دقیقه در دمای ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۳۵ چرخه انجام شد. PCR ثانویه نیز با همان شرایط دمایی در ۳۰ چرخه انجام شد.

حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرو لیتر که شامل ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس، ۲ میکرولیتر از مخلوط دو پرایمر رفت و برگشت (۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر از DNA و ۶ میکرولیتر آب مقطر بود.

لازم به ذکر است که محصول PCR اولیه به نسبت ۱/۱۰۰ در آب‌مقطر رقیق شد و ۱ میکرولیتر از آن به عنوان نمونه‌ی DNA در PCR ثانویه استفاده شد.

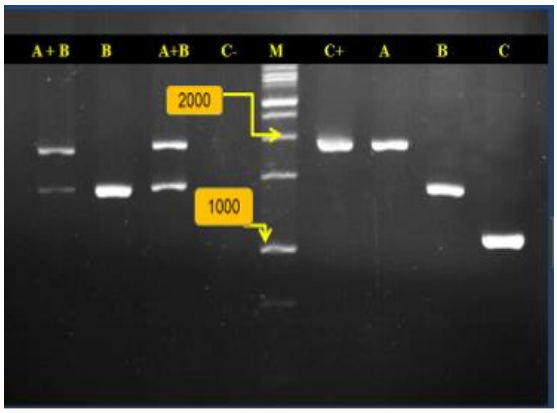
در هر سری ده‌تایی از آزمایش‌ها، یک نمونه‌ی شاهد منفی (آب‌مقطر) و یک نمونه‌ی شاهد مثبت جهت تأیید کار استفاده شد. پس از الکتروفورز، محصول PCR نتایج در کنار نشانگر ۵۰۰ جفت بازی و بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده شد.

طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی، برای تعیین پارازیتمی از ۱۰۰ میدان میکروسکوپی گسترش ضخیم و یا در مقابل ۵۰۰–۲۰۰ گلبول سفید تعداد انگل‌ها شمارش شد و از فرمول زیر، تعداد کل انگل در میکرولیتر خون که به طور تقریبی دارای ۸۰۰۰ گلبول سفید در انسان است، محاسبه گردید:

تعداد انگل شمارش شده × ۸۰۰۰/تعدادگلبول سفید شمارش شده = تعداد انگل در میکرولیتر خون

یافته‌ها

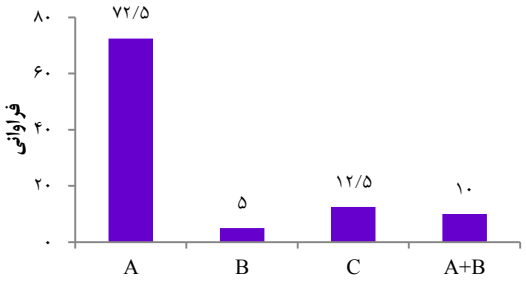
این تحقیق به منظور بررسی میزان فراوانی انواع ژنوتایپ‌های پلاسمودیوم ویواکس بر اساس ژن MSP-3α در بیماران مبتلا به مالاریای مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی استان اصفهان با استفاده از روش Nested PCR انجام شد. بر اساس اندازه‌ی محصول PCR سه نوع ژنوتایپ A (در حدود ۱۹۰۰ جفت‌باز)، B (در حدود ۱۶۰۰ جفت‌باز)، C (در حدود ۱۲۰۰ جفت‌باز) از ژن PvMSP-3α مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصول Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

محصول PCR سه نوع ژنوتایپ A (در حدود ۱۹۰۰ جفت‌باز)، B (در حدود ۱۶۰۰ جفت‌باز)، C (در حدود ۱۲۰۰ جفت‌باز). ستون ۱ و ۳ (از سمت چپ) آلودگی توأم ژنوتیپ A و B را نشان می‌دهد. M نشانگر ۵۰۰ جفت‌بازی، -C: شاهد منفی، +C: شاهد مثبت

در ۲۹ بیمار (۷۲/۵ درصد) فقط ژنوتایپ A، در ۲ بیمار (۵/۰ درصد) ژنوتایپ B، در ۵ بیمار (۱۲/۵ درصد) ژنوتایپ C و در ۴ بیمار (۱۰/۰ درصد) هر دو ژنوتایپ A و B مشاهده شد. بنابراین، ژنوتایپ A در ۷۲/۵ درصد بیماران، بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد (شکل ۲).



شکل ۲. درصد میزان فراوانی انواع ژنوتایپ‌ها در بیماران

در این تحقیق، تعداد انگل در هر میکرولیتر خون به تفکیک نوع ژنوتایپ با هم مقایسه شد. آزمون One-way ANOVA نشان داد که میانگین تعداد انگل در میکرولیتر خون بین انواع ژنوتایپ اختلاف معنی‌دار (P = ۰/۰۴۰) دارد (جدول ۲). آزمون تعقیبی Least significant difference (LSD) (حداقل اختلاف معنی‌دار) نشان داد میانگین تعداد انگل در میکرولیتر خون در ژنوتایپ C به طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتایپ B بود، اما بین انواع دیگر ژنوتایپ، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۲. میانگین تعداد انگل در میکرولیتر خون بین انواع ژنوتایپ

انواع ژنوتایپ	میانگین ± انحراف معیار	مقدار P
A	۷۲۲/۵ ± ۸۴/۹	۰/۰۴۰
B	۳۸۵/۰ ± ۱۳۵/۰	
C	۱۰۳۲/۰ ± ۱۸۴/۸	
A و B	۹۴۵/۰ ± ۲۱۵/۹	

بحث

در دهه‌های اخیر، تحقیقات زیادی در زمینه‌ی تهیه‌ی واکسن مالاریا انجام شده است، اما به دلایل مختلفی از جمله تنوع و تغییر در آنتی‌ژن‌های پلاسمودیوم، متفاوت بودن سویه‌های انگل مالاریا در مناطق مختلف، تنوع در مراحل و اشکال انگل در طول چرخه‌ی زندگی با خصوصیات آنتی‌ژنیک متفاوت، ساخت واکسن موفقیت‌آمیز نبوده است. بنابراین، به نظر می‌رسد که تحقیقات بیشتر بر روی ساختمان ژنتیکی انگل‌های پلاسمودیوم، برای توسعه‌ی واکسن و دارو علیه انگل ضروری باشد.

تا کنون مطالعات متعددی متکی بر توالی‌یابی و تنوع ژنتیکی P.vivax با استفاده از ژن PvMsp1 انجام گرفته است (۷). تحقیقات نشان داده است با وجود شباهت‌های ریخت‌شناسی انگل‌های یک گونه، تنوع بیولوژیک و ایمونولوژیک در یک گونه بسیار شایع است. تحقیق بر روی محصولات PCR ژن PvMsp3α به وضوح سه ژنوتایپ با وزن مولکولی (۲۲۰۰–۱۷۰۰ جفت‌باز)، (۱۷۰۰–۱۴۰۰ جفت‌باز) و (۱۴۰۰–۱۰۰۰ جفت‌باز) با نام‌های A، B و C را نشان می‌دهد.

نتایج چندین مطالعه بر روی ساختمان ژنتیکی پلاسمودیوم ویواکس در مناطق مالاریاخیز ایران نشان داده است که ژن PvMsp3α به عنوان یک نشانگر پلی‌مورفیک قوی، می‌تواند برای تعیین ژنوتیپ و همچنین، عفونت‌های انگلی با ژنوتایپ توأم مورد استفاده قرار گیرد (۱۱–۹)، اما تاکنون مطالعاتی بر روی تنوع ژنتیکی آن در مناطقی مانند اصفهان که مالاریای وارده (Imported malaria) در آن شناسایی شده است صورت نگرفته است.

مطالعه‌ی حاضر که بر روی ۴۰ نمونه‌ی خون افراد مبتلا به P.vivax انجام گرفت، نشان داد تنوع ژنتیکی با سه نوع ژنوتایپ A (حدود ۱۹۰۰ جفت‌باز)، B (حدود ۱۶۰۰ جفت‌باز) و C (حدود ۱۲۰۰ جفت‌باز) از ژن PvMSP-3α در این ناحیه وجود دارد. این نتیجه، حاکی از تشابه اندازه‌ی محصول PCR با سایر مطالعات انجام شده در ایران و سایر کشورها می‌باشد (۱۱–۹). در مطالعه‌ی شهبازی وهمکاران، فراوانی سه ژنوتایپ A، B و C به ترتیب ۷۸، ۶ و ۱۶ درصد گزارش شدکه با مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی داشت (۹). همچنین، نتایج گزارش شده از افغانستان که توسط ذاکری و همکاران بر روی ژن PvMSP-3α انجام گرفت، نشان داد همانند مطالعه‌ی حاضر، بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتایپ A با ۷۰ درصد و کمترین فراوانی مربوط به ژنوتایپ B می‌باشد (۱۳). از آن جایی که در مطالعه‌ی حاضر ۲۹ نفر از افراد ملیت افغانی داشتند، مشخص می‌شود که الگوی بیماری مالاریا طی ده سال اخیر در افغانستان تغییری نکرده است.

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Kaul و همکاران در هندوستان انجام گرفت، اندازه‌ی محصول PCR سه نوع ژنوتایپ A (در حدود ۲۰۰۰ جفت‌باز)، B (در حدود ۱۴۰۰ جفت‌باز)، C (در حدود ۱۲۰۰ جفت‌باز) نشان داد. مقایسه‌ی این نتایج با مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که بیشترین فراوانی ژنوتایپ در هر دو مطالعه مربوط به ژنوتایپ A می‌باشد؛ این در حالی است که میزان فراوانی ژنوتایپ B با ۱۹/۴۴ درصد نسبت به ژنوتایپ C با ۹/۷۲ درصد بیشتر می‌باشد که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر متفاوت است (۱۴). در مطالعه‌ی حاضر، ۱۰ درصد نمونه‌ها، به صورت توأم ژنوتایپ A و ژنوتایپ B را نشان دادند، اما در مطالعه‌ی Kaul و همکاران، میزان ژنوتایپ A و ژنوتایپ B به صورت هم‌زمان ۲ درصد گزارش شد (۱۴). این نتایج، حاکی از آن است که اگر چه میزان آلودگی‌های توأم در دو مطالعه متفاوت است، اما قطعه‌ی ژنی PvMsp3α توانایی نشان دادن آلودگی‌های هم‌زمان به ژنوتایپ‌های مختلف را دارد.

مطالعه‌ی Ord و همکاران در ونزوئلا، مشخص کرد که بیشترین میزان فراوانی مربوط به ژنوتایپ A با ۵۹/۳ درصد و کمترین میزان فراوانی مربوط به ژنوتایپ C با ۱۸/۸ درصد می‌باشد (۱۵). این در حالی است که در مطالعه‌ی حاضر، بیشترین میزان فراوانی مربوط به ژنوتایپ A بوده است، اما کمترین میزان فراوانی مربوط به ژنوتایپ B می‌باشد. در مطالعه‌ای که در پاکستان انجام شد، ژنوتایپ دیگری با عنوان ژنوتایپ D و با وزن کمتر از ۱کیلودالتون گزارش شد (۱۶) که این ژنوتایپ، در میان نمونه‌های مطالعه‌ی حاضر دیده نشد. با توجه به این مطالعات، به نظر می‌رسد در موقعیت‌های جغرافیایی مختلف، نه تنها میزان فراوانی ژنوتایپ‌ها تفاوت دارند؛ بلکه احتمال وجود ژنوتایپ‌های دیگری هم هست.

همچنین، در مقایسه‌ای که بین میانگین تعداد انگل در هر میکرولیتر خون با انواع مختلف ژنوتایپ‌های پلاسمودیوم ویواکس انجام گرفت، مشخص شد میانگین تعداد انگل در میکرولیتر خون در ژنوتایپ‌های مختلف، متفاوت است و این تعداد در ژنوتایپ C، به طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتایپ B می‌باشد. با توجه به این که این مقایسه تاکنون در مطالعات دیگر انجام نشده است، برای تعمیم یافته‌ها، به مطالعات بیشتری نیاز است. ممکن است میزان پارازیتمی نمایانگر متفاوت بودن الگوی عود، علایم بیماری، طول مدت عفونت، پاسخ ایمنی و مقاومت در ژنوتایپ‌های مختلف بوده و در تحقیقات تهیه‌ی واکسن کمک کننده باشد.

نتایج به دست آمده از این مطالعه، نشان می‌دهد تنوع ژنوتایپ ژن PvMSP-3α در ایران با دیگر مناطق دنیا تا حدود زیادی هم‌خوانی دارد و هر سه ژنوتایپ با محدوده‌ی وزن مشخص شده در همه‌ی مطالعات مشاهده شده است، اما از نظر میزان فراوانی، این تنوع در مناطق مختلف با هم اختلاف دارد. این تفاوت در میزان فراوانی، می‌تواند ناشی از این باشد که هر منطقه، دارای ویژگی‌های خاص خود از نظر اپیدمیولوژیکی و شرایط انتقال بیماری باشد. همچنین، به نظر می‌رسد که توزیع سویه‌های پلاسمودیوم ویواکس در مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه، نشان می‌دهد که استفاده از PCR بر روی ژن PvMSP-3α یک تکنیک ساده، مناسب، کاربردی و مفید برای مطالعات اپیدمیولوژیک ایزوله‌های پلاسمودیوم ویواکس می‌باشد.

همچنین، می‌توان از ژن PvMSP-3α در مناطقی که مالاریا به صورت وارده وجود دارد نیز به عنوان نشانگر اپیدمیولوژیک جهت تشخیص انواع ژنوتایپ‌های پلاسمودیوم ویواکس و تعیین عفونت‌های هم‌زمان استفاده کرد که چون نیاز به توالی‌یابی ندارد، هزینه‌های آن نیز کاهش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی به شماره‌ی ۳۹۶۵۹۴ است که با همکاری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است. از همکاری معاونت پژوهشی، گروه انگل و قارچ‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی و مراکز بهداشتی استان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: Past, present, and future. Lancet Infect Dis 2004; 4(6): 327-36.
2. World Health Organization. World malaria report 2019. Geneva, Switzerland: WHO; 2019.
3. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global epidemiology of plasmodium vivax. Am J Trop Med Hyg 2016; 95(6 Suppl): 15-34.
4. Dayananda KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of Plasmodium vivax malaria. J Vector Borne Dis 2018; 55(1): 1-8.
5. Taylor BJ, Martin KA, Arango E, Agudelo OM, Maestre A, Yanow SK. Real-time PCR detection of Plasmodium directly from whole blood and filter paper samples. Malar J 2011; 10: 244.
6. Srisutham S, Saralamba N, Malleret B, Renia L, Dondorp AM, Imwong M. Four human Plasmodium species quantification using droplet digital PCR. PLoS One 2017; 12(4): e0175771.
7. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJ, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. FEMS Microbiol Rev 2016; 40(3): 343-72.
8. Vatandoost H, Raeisi A, Saghafipour A, Nikpour F, Nejati J. Malaria situation in Iran: 2002-2017. Malar J 2019; 18(1): 200.
9. Shahbazi A, Raeisi A, Nateghpour M, Mirhendi H, Mohebali M, Asmar M. Polymorphism of merozoite surface protein-3a gene of plasmo-dium vivax in isolates of Iran. Iran J Parasitol 2008; 3(2):15-20.
10. Zakeri S, Barjesteh H, Djadid ND. Merozoite surface protein-3α is a reliable marker for population genetic analysis of Plasmodium vivax. Malaria Journal 2006; 5(1): 53.
11. 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(3): 394-400.
12. Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Snounou G, Day KP. Polymorphism at the merozoite surface protein-3alpha locus of Plasmodium vivax: Global and local diversity. Am J Trop Med Hyg 1999; 61(4): 518-25.
13. Zakeri S, Safi N, Afsharpad M, Butt W, Ghasemi F, Mehrizi AA, et al. Genetic structure of Plasmodium vivax isolates from two malaria endemic areas in Afghanistan. Acta Trop 2010; 113(1): 12-9.
14. Kaul A, Bali P, Anwar S, Sharma AK, Gupta BK, Singh OP, et al. Genetic diversity and allelic variation in MSP3alpha gene of paired clinical Plasmodium vivax isolates from Delhi, India. J Infect Public Health 2019; 12(4): 576-84.
15. Ord R, Polley S, Tami A, Sutherland CJ. High sequence diversity and evidence of balancing selection in the Pvmsp3alpha gene of Plasmodium vivax in the Venezuelan Amazon. Mol Biochem Parasitol 2005; 144(1): 86-93.
16. Khan SN, Khan A, Khan S, Ayaz S, Attaullah S, Khan J, et al. PCR/RFLP-based analysis of genetically distinct Plasmodium vivax population of Pvmsp-3alpha and Pvmsp-3beta genes in Pakistan. Malar J 2014; 13: 355.

DOI: *10.22122/jims.v38i600.13330* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 38, No. 600, 4th Week, January 2021**

Received: 15.08.2020 Accepted: 24.10.2020 Published: 26.01.2021

The Genotyping of MSP-3α Gene of Plasmodium Vivax in Patients with Malaria by Nested Polymerase Chain Reaction Technique

Sepideh Tolouei[1], Seyed Amirreza Zahir-Mirdamadi[2], Seyed Hossien Hejazi[3], Zahra Ghayour-Nagafabadi[1]

Original Article

Abstract

Background: Genotyping study and genetic diversity increase basic information about the parasites that cause malaria disease. These studies may support new treatment for disease, and control program in the future. Therefore, the present study was conducted to investigate the genetic structure and genotypes frequency based on MSP-3a gene of Plasmodium vivax in patients with Malaria reported in Isfahan City, Iran.

Methods: Forty samples of patients infected with Plasmodium vivax, who were referred to laboratories of Isfahan health centers, were collected. The samples were tested using specific primers based on MSP-3a gene by nested polymerase chain reaction (PCR) method.

Findings: Based on PCR product size, three genotypes of PvMSP-3a gene as A (about 1900 bp), B (about 1600 bp), and C (about 1200 bp) were observed. The most frequent genotype was genotype A with 72%, and 10% of the patients showed both genotype A and B.

Conclusion: The results show that PvMSP-3α genotype can be used as a genetic marker in both endemic and imported malaria areas. This gene also is acceptable as epidemiologic marker for diagnosis of Plasmodium vivax genotyping, and detection of mixed infection having both genotypes.

Keywords: Malaria; Genotype; Plasmodium vivax; Polymerase chain reaction

Citation: Tolouei S, Zahir-Mirdamadi SA, Hejazi SH, Ghayour-Nagafabadi Z. **The Genotyping of MSP-3α Gene of Plasmodium Vivax in Patients with Malaria by Nested Polymerase Chain Reaction Technique.** J Isfahan Med Sch 2021; 38(600): 856-61.

1- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Iran
2- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Iran
3- Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Iran
Corresponding Author: Zahra Ghayour-Nagafabadi, Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Iran; Email: ghayour@med.mui.ac.ir