

DOI:10.13350/j.cjpb.220622

· “一带一路”专题研究 ·

中缅边境地区恶性疟原虫氯喹抗性相关基因的多态性分析*

叶升玉^{1,2}, 李春富¹, 唐烨榕¹, 叶润^{2**}, 周红宁^{1**}

(1. 云南省寄生虫病防治所, 云南省虫媒传染病防控重点实验室, 云南省虫媒传染病防控关键技术创新团队, 云南普洱 665000; 2. 中国人民解放军海军军医大学热带病学教研室)

【摘要】 目的 分析中缅边境地区恶性疟原虫氯喹抗性相关基因的多态性。方法 收集 2001-2012 年中国云南省西双版纳州景洪市、缅甸克钦邦拉咱市和掸邦第二特区勐冒县恶性疟病例滤纸血标本 175 份, 采用巢式 PCR 法扩增恶性疟原虫氯喹抗性转运蛋白基因(*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene, *pfcr*)基因第 72-76 位点片段和多药耐药基因 1(*Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1, *pfmdr1*)基因第 86-1246 位点片段, 并对扩增产物测序分析。结果 共检测到 *pfcr* 基因 5 种突变型(CVIEK, CVIDK, SVMNT, CVIET, CVIDT), 该 3 个地区均以三重突变型(CVIET)为主, 其中, 中国云南西双版纳 CVIET 由 2001 年的 76.7% 上升至 2006 年的 100%, 缅甸拉咱市由 2001 年的 75% 上升至 2007 年的 95%, 但 2012 年又下降至 77.5%, 缅甸勐冒县 2009 年该突变型占比为 67.5%。共检测到 *pfmdr1* 基因 5 种单突变型(N86Y, E130K, Y184F, S1034C, F1226Y)和 2 种双重突变型(N86Y/F1226Y, Y184F/F1226Y), 其中 2001 年西双版纳 *pfmdr1* 基因野生型占 36.7%, N86Y 和 Y184F 突变率均为 20%, F1226Y 突变率为 16.7%, 而 2006 年以 F1226Y 突变为主占 40%, 且检测到二重突变型(N86Y/F1226Y 和 Y184F/F1226Y)占 8%; 缅甸拉咱市 *pfmdr1* 基因 Y184F 突变率从 2001 年的 25% 升高至 2007 年的 35% 和 2012 年的 37.5%, 该 3 年中野生型分别占 65%、40% 和 55%; 2009 年缅甸勐冒县 *pfmdr1* 基因野生型比例为 47.5%, Y184 和 N86Y 单突变型分别为 27.5% 和 25%。结论 中缅边境恶性疟原虫 *pfcr* 基因均以三重突变型(CVIET)为主, 氯喹抗性均较高, 可为中缅边境地区恶性疟的防治提供参考。

【关键词】 恶性疟原虫; *pfcr* 基因; *pfmdr1* 基因; 多态性; 中缅边境地区

【中图分类号】 R382.31

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)06-0724-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jun.; 17(6):724-729.]

Polymorphisms of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistant genes in China-Myanmar border

YE Sheng-yu^{1,2}, LI Chung-fu¹, TANG Ye-rong¹, YE Run², ZHOU Hong-ning¹ (1. The Yunnan Provincial Key Laboratory of Insect-borne Infectious Diseases Control & the Yunnan Provincial Key Technology Innovation Team for Prevention and Control of Insect Vectors of Yunnan Institute of Parasitic Diseases, Pu'er, Yunnan 665000, China; 2. Department of Tropical Diseases, Navy Medical University)***

【Abstract】 **Objective** To monitor and analyze the polymorphisms of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistant genes in three areas along the China Myanmar border. the dynamic changes of chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in three areas along the China Myanmar border by detecting the mutations of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene (*pfcr*) and *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 (*pfmdr1*) gene. **Methods** Totally 175 *P. falciparum* filter paper blood samples were collected in Jinghong City, Xishuangbanna Prefecture of Yunnan Province, China and Lazan City of Kachin State and Mengmao County, the Second Special Zone of Shan State in Myanmar from 2001 to 2012. The fragments of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene (*pfcr*) *pfcr* gene (positions 72 to 76) and *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 (*pfmdr1*) *pfmdr1* gene (positions 86 to 184, and positions 1034 to 1246) were amplified by Nested PCR, and then products were sequenced and statistically analyzed. **Results** Five haplotypes (CVIEK, CVIDK, SVMNT, CVIET and CVIDT) were detected from positions 72 to 76 of *pfcr* gene, of which the triple mutants (CVIET) was the major haplotype in three areas. The percentage of haplotype CVIET was 76.7% in 2001 and increased to 100% in 2006 in Xishuangbanna. In Lazan City, the percentage of haplotype CVIET increased from 75% in 2001 to 95% in 2007 but decreased to 77.5% in 2012, and it accoun-

* **【基金项目】** 云南省重点研发计划项目(No. 202103AQ100001); 澜湄合作专项基金项目(No. 2020399)。

** **【通讯作者】** 周红宁, E-mail: zhounh66@163.com; 叶润, E-mail: yerun85@163.com

【作者简介】 叶升玉(1994-), 女, 云南腾冲人, 博士研究生在读, 主要从事虫媒传染病防治研究。E-mail: xy229104435@aliyun.com

ted for 67.5% in Mengmao County in 2009. Single mutants (N86Y, E130K, Y184F, S1034C and F1226Y) and double mutants (N86Y/F1226Y and Y184F/F1226Y) were detected in the *pfmdr1* gene. In Xishuangbanna, isolates with wild type *pfmdr1* gene accounted for 36.7%, the proportions of the mutant N86Y, Y184F and F1226Y was 20%, 20% and 16.7% in 2001, respectively. While in 2006, the rate of mutant F1226Y increased to 40%, and double mutants (N86Y/F1226Y and Y184F/F1226Y) was also identified, which accounted for 8% in total. In Lazan City, the rate of single mutants Y184F of *pfmdr1* increased from 25% in 2001 to 35% in 2007 and 37.5% in 2012, the proportion of wild type *pfmdr1* accounted for 65%, 40%, 55%, respectively. In Mengmao County, the proportion of isolates with wild-type *pfmdr1* gene was 47.5% in 2009, single mutants of Y184 and N86Y accounted for 27.5% and 25%, respectively. **Conclusion** Triple mutants (CVIET) of *pfcr1* gene were the main haplotype among three areas of China-Myanmar border. For *pfmdr1* gene, F1226Y mutation was mainly occurred in Xishuangbanna, Y184F mutation was mainly occurred in Lazan, and Y184F or N86Y were the main mutations in Mengmao. The results suggested that chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* was generally high in China-Myanmar border regions, which also provide guidance for the treatment of *Plasmodium falciparum* in China-Myanmar border and the drug resistance should be monitored continuously.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*; *pfcr1* gene; *pfmdr1* gene; Polymorphism; China-Myanmar border

疟疾是一种严重危害人类健康的重要传染病,据世界卫生组织统计,2019年全球疟疾感染人数约为2.19亿,造成40.9万例死亡^[1]。氯喹曾经是治疗疟疾的一线药物,但长期使用氯喹治疗恶性疟容易产生氯喹耐药性^[2]。恶性疟原虫氯喹耐药性的产生与恶性疟原虫氯喹抗性转运蛋白基因(*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene, *pfcr1*)和多药耐药基因1(*Plasmodium falciparum* multi-drug resistance gene 1, *pfmdr1*)突变密切相关,其中 *pfcr1* 基因第2个外显子编码的第72、74、75和76位氨基酸密码子错义突变(导致C72S、M74I、N75E和K76T变异)与氯喹耐药性有关,其中K76T变异可通过改变 *pfcr1* 蛋白的疏水性结构,造成氯喹在消化泡内结合力降低并被排出,致使虫体内药物浓度下降并形成抗性,而C72S、M74I、N75E的变异对于调节或弥补K76T变异出现的有补偿作用^[3-6]; *pfcr1* 基因的72-75位密码子发生多重突变的现象比较普遍,其中尤以三重突变型(C₇₂V₇₃I₇₄E₇₅T₇₆, CVIET)和二重突变型(S₇₂V₇₃M₇₄N₇₅T₇₆, SVMNT)较为常见^[7-11]。对于 *pfmdr1* 基因,在第86、184、1034、1042、1246位氨基酸密码子错义突变(导致N86Y、Y184F、S1034C、N1042D和D1246Y变异)会导致恶性疟原虫对氯喹、喹啉、甲氟喹、卤泛群和本苄醇等抗疟药耐药^[12-16],而且不同地区 *pfmdr1* 基因的突变多态差异较明显,如在亚洲和非洲恶性疟原虫种群中以N86Y和Y184F变异常见,在我国云南和海南的恶性疟原虫株 *pfmdr1* 基因均以86号密码子错义突变(N86Y)较为常见^[17-18]。

此外,当 *pfcr1* 与 *pfmdr1* 变异同时存在时,可加剧氯喹耐药性产生及其程度,如 *pfmdr1* 基因的86号密码子错义突变(N86Y)合并 *pfcr1* 基因76号密码子的错义突变(K76T)时,恶性疟原虫氯喹耐药性产生的

关联性较为显著^[19]。本研究通过检测中缅边境3个地区恶性疟原虫种群的 *pfcr1* 和 *pfmdr1* 基因突变多态性特征,为当地恶性疟防治提供理论依据。

材料与方法

1 材料

1.1 标本来源 共收集恶性疟现症病例外周血样175份,每份血样体积约100 μl,并制作成滤纸血滴进行运输、保存。血样采集地分别为云南省西双版纳州景洪市,缅甸克钦邦拉咱市以及掸邦第二特区勐冒县(表1)。

表1 恶性疟原虫滤纸血样本信息

Table 1 Information of *P. falciparum* samples

地点 Sites	年份 Year	样本数 Samples
西双版纳	2001	30
	2006	25
拉咱	2001	20
	2007	20
	2012	40
勐冒	2009	40
合计 Total		175

采集患者的静脉血制作滤纸血样本,-20℃冰箱低温保存。标本经镜检确定为恶性疟原虫感染,患者均签订标本采集知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒购于德国 QIAGEN 公司;PCR 扩增酶购于上海硕盟生物有限公司;Applied Biosystems Veriti™ PCR 仪购于美国 ABI 公司;JY-SPCT 电泳仪购于北京君意东方电泳设备有限公司;Universal HOOD II 凝胶成像系统购于美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 基因组提取 按照 QIAamp DNA Mini Kit 提取试剂盒说明书进行基因组 DNA 抽提,-20℃保存备

用。

2.2 *pfprt* 和 *pfmdr1* 基因巢式 PCR 扩增

2.2.1 引物设计与合成

参考文献[20-21]设计引物序列,分别扩增 *pfprt* 基因第 72-76、97 位点片段和 *pfmdr1* 基因第 86、130、184、1034、1 042 和 1 246 位点片段。引物由北京六合华大基因科技有限公司上海分公司合成,引物序列见表 2。

表 2 恶性疟原虫 *pfprt* 和 *pfmdr1* 基因扩增引物
Table 2 Primers for amplification of *pfprt* and *pfmdr1* genes

引物名称 Primers	序列(5' - 3') Sequences(5' - 3')	位点 Positions
<i>pfprt</i> OF	CCGTTAATAATAAATACACGCAG	
<i>pfprt</i> OR	TTTTGAATTTCCCTTTTATTTCC	第 72-
<i>pfprt</i> IF	GACCTTAACAGATGGCTCAC	76 位点
<i>pfprt</i> IR	AACAATAAAGAACATAATCATACTTAAATGTTTACCTGCACAACAT-AGAAAATT	
<i>pfmdr1</i> OF-1	CTCCACAATAAAGCTGACAGTTCTTA	第 86-
<i>pfmdr1</i> OR-1	TGTATGTGCTGTATTATCAGGA	184 位点
<i>pfmdr1</i> IF-1	CTCTTCTATAATGGACATGGTA	
<i>pfmdr1</i> IR-1	AATTTGATAGAAAAGCTATTGATTATAA	
<i>pfmdr1</i> OF-2	TATTTGGTAATGATTGATAAATTCATC	第 1034-
<i>pfmdr1</i> OR-2	GAATTATGTAAATGCAGCTTTA	1246 位点
<i>pfmdr1</i> IF-2	GCAGCAAACCTACTAACACG	
<i>pfmdr1</i> IR-2		

注:OF 与 OR 为第一轮引物;IF 和 IR 为第二轮引物。
Notes:OF and OR are first round primers;IF and IR are second round primers.

2.2.2 *pfprt* 和 *pfmdr1* 基因 PCR 扩增

以基因组 DNA 为模板进行第一轮 PCR 扩增。反应体系(15 μ l):ddH₂O 8.3 μ l,10 \times PCR Buffer 1.5 μ l,MgSO₄(25 mmol/L)0.6 μ l,dNTPs(2 mmol/L)1.5 μ l,上、下游引物各 0.4 μ l(10 mmol/L),模板 DNA 2 μ l,KOD-Plus-Neo(1.6 mg/ml)0.2 μ l;第二轮 PCR 反应取第一轮产物 1 μ l 作为模板,其余与第一轮相同。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min;98 $^{\circ}$ C 20 s,58 $^{\circ}$ C 20 s,68 $^{\circ}$ C 30s,共 30 个循环;68 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

2.2.3 PCR 扩增产物序列分析

取 *pfprt* 和 *pfmdr1* 基因第二轮 PCR 产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定后进行二代测序,用 Mega 7.0 软件分析目的测序产物位点突变情况。

2.2.4 统计学分析

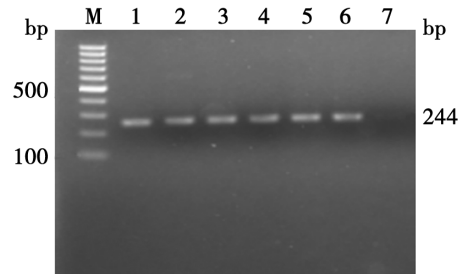
将样本信息、*pfprt* 和 *pfmdr1* 基因片段的碱基突变结果等用 Microsoft Office Excel 2007 软件建立数据库,用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析。采用 χ^2 检验进行不同地区区间的 *pfprt* 和 *pfmdr1* 基因野生型占比或基因突变率(%)分析, χ^2 应用条件不满足时采用 Fisher 确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 *pfprt* 基因及 *pfmdr1* 基因的 PCR 扩增

中缅边境地区 3 个样本采集地的 175 份样本均扩

增出 *pfprt* 基因及 *pfmdr1* 基因的目的片段,其中 *pfprt* 基因第 72-76 位点片段大小约为 244 bp(图 1),*pfmdr1* 基因第 86-184 位点片段大小约为 526 bp(图 2),第 1034-1246 位点片段大小约为 799 bp(图 3)。

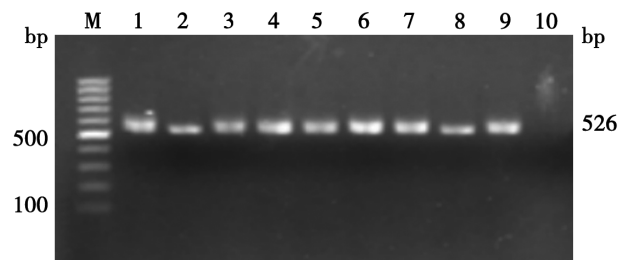


M DNA 标志物(DL 100 bp) 1~6 恶性疟样本 7 阴性对照

图 1 *pfprt* 基因 PCR 扩增产物

M DL 100 bp DNA molecular marker 1-6 Samples 7 Negative control

Fig. 1 Nested PCR amplification product of *pfprt*

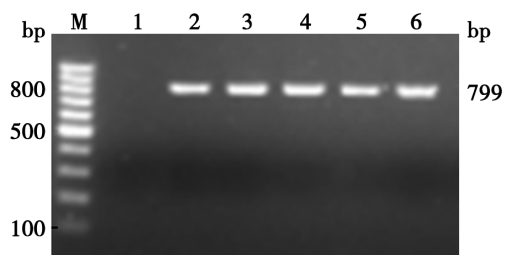


M DNA 标志物(DL 100 bp) 1~9 恶性疟样本 10 阴性对照

图 2 *pfmdr1* 基因 PCR 扩增产物片段 1

M DL 100 bp DNA molecular marker 1-9 Samples 10 Negative control

Fig. 2 First nested PCR amplification product of *pfmdr1*



M DNA 标志物(DL 100 bp) 1 阴性对照 2~6 恶性疟样本

图 3 *pfmdr1* 基因 PCR 扩增产物片段 2

M DL 100 bp DNA molecular marker 1 Negative control 2-6 Samples

Fig. 3 Second nested PCR amplification product of *pfmdr1*

2 *pfprt* 基因突变情况

pfprt 基因在 72-76 位点上共检测到 5 种突变型(CVIEK,CVIDK,SVMNT,CVIET,CVIDT),且三个地区均以三重突变型(CVIET)为主,其中西双版纳 CVIET 由 2001 年的 76.7%(23/30)上升至 2006 年的 100%(25/25);拉咱市由 2001 年的 75%(15/20)上升至 2007 年的 95%(19/20),2012 年又下降至 77.5%(31/40),勐冒县 2009 年占比为 67.5%(27/40)。此

外,在西双版纳检测到1例双重突变型(CVIEK),在拉咱市检测到1例双重突变型(SVMNT)及3例三重突变型(CVIDT),在勐冒县检测到1例双重突变型(CVIDK),12例双重突变型(SVMNT)(图4)。

3 *pfmdr1* 基因突变情况

pfmdr1 基因共检测到5种单突变型(N86Y, E130K, Y184F, S1034C, F1226Y)及2种双重突变型(N86Y/F1226Y, Y184F/F1226Y), 2001年西双版纳*pfmdr1* 基因野生型占36.7%(11/30), N86Y和Y184F突变率均为20%(6/30), F1226Y突变率为16.7%(5/30), 而2006年以F1226Y突变为主占40%(10/25), 且检测到二重突变型(N86Y/F1226Y和Y184F/F1226Y), 占8%; 缅甸拉咱市*pfmdr1* 基因

Y184F突变率从2001年的25%(5/20)升高至2007年的35%(7/20)和2012年的37.5%(15/40), 3个年份野生型分别占65%(13/20), 40%(8/20)和55%(22/40), 此外在该地区还检测到单突变(E130K)4例及双重突变型(Y184F/F1226Y)1例; 2009年缅甸勐冒县*pfmdr1* 基因野生型比例为47.5%(19/40), Y184F和N86Y单突变型分别为27.5%(11/40)和25%(10/40)(图5)。

4 *pfcr1* 基因及 *pfmdr1* 基因突变位点统计学分析

上述三个地区恶性疟原虫*pfcr1* 基因的C72S、M74I和N75E突变率差异有统计学意义($P < 0.05$); *pfmdr1* 基因的N86Y和F1226Y突变率差异有统计学意义($P < 0.05$)(表3)。

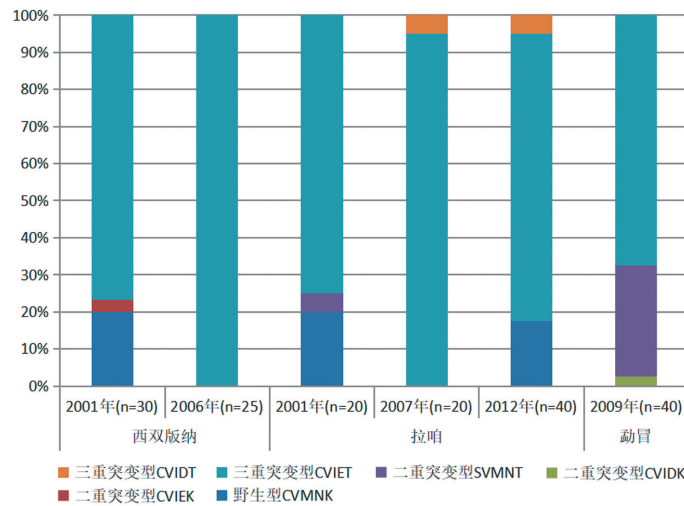


图4 西双版纳、拉咱和勐冒地区 *pfcr1* 基因多态性

Fig. 4 Polymorphisms of *pfcr1* gene in Xishuangbanna, Lazan and Mengmao region

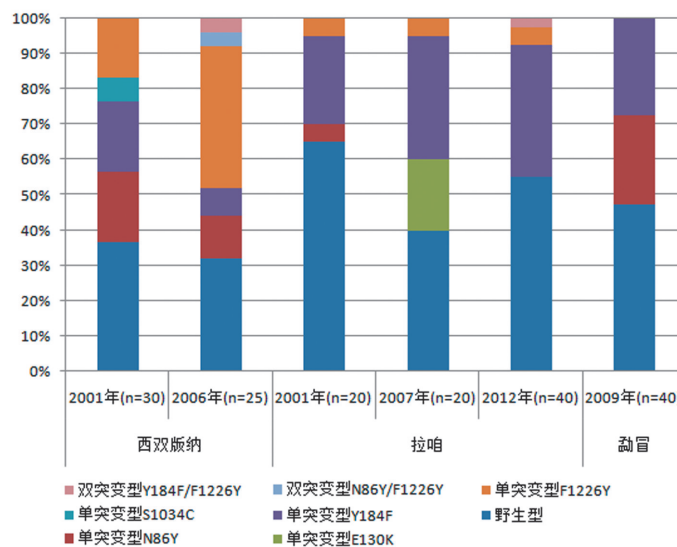


图5 西双版纳、拉咱和勐冒地区 *pfmdr1* 基因多态性

Fig. 5 Polymorphisms of *pfmdr1* gene in Xishuangbanna, Lazan and Mengmao region

表3 中缅边境地区 *pfcr1* 和 *pfmdr1* 基因突变情况
Table 3 Mutation of *pfcr1* and *pfmdr1* genes in the border areas of China-Myanmar

基因 Genes	突变 位点 Mutation	西双版纳(n=55) Xishuangbanna		拉咱(n=80) Lazan		勐冒(n=40) Mengmao		合计(n=175) Total		χ ² 值 χ ² value	P 值 P value
		突变样 本数	突变率 (%)	突变样 本数	突变率 (%)	突变样 本数	突变率 (%)	突变样 本数	突变率 (%)		
		Mutation Samples	Mutation rate(%)	Mutation Samples	Mutation rate(%)	Mutation Samples	Mutation rate(%)	Mutation Samples	Mutation rate(%)		
<i>pfcr1</i>	C72S	0	0	0	0	12	30	12	6.9	33.234	<0.001
	M74I	49	89.1	68	85	27	67.5	144	82.3	8.151	0.018
	N75E	49	89.1	65	81.3	27	67.5	141	80.6	6.940	0.031
	N75D	0	0	3	3.8	1	2.5	4	2.3	1.897	0.355
	K76T	48	87.3	68	85	39	97.5	155	88.6	4.562	0.106
<i>pfmdr1</i>	N86Y	10	18.2	1	1.3	10	25	21	12	19.490	<0.001
	E130K	0	0	4	5	0	0	4	2.3	3.359	0.147
	Y184F	9	16.4	28	35	11	27.5	48	27.4	5.687	0.063
	S1034C	2	3.6	0	0	0	0	2	1.1	3.032	0.149
	F1226Y	17	30.9	5	6.3	0	0	22	12.6	25.487	<0.001

讨论

在云南,1999年杨亚明等^[22]报道云南省西双版纳州恶性疟原虫 *pfcr1* K76T 突变率较高(96.7%),2003-2004年 K76T 突变率仍较高(92.8%),且以三重突变型(CVIET)为主^[23];2012-2015年朱垚吉等^[24]对云南本地感染的恶性疟病例检测发现,*pfcr1* 基因 K76T 突变占 93.3%,同样以三重突变型(CVIET)为主。本研究中2001年和2006年西双版纳州景洪市恶性疟原虫 *pfcr1* 基因也以三重突变型(CVIET)为主,但2001年的 K76T 突变率相对低(80%),存在 20%的野生型,可能与当地长期停止使用氯喹治疗恶性疟有关。在缅甸拉咱市,*pfcr1* 基因 K76T 突变普遍存在,2007-2009年的样本中其突变率为 100%^[25];2007-2012年当地恶性疟原虫样本的 *pfcr1* 基因均以三重突变型(CVIET)为主^[26]。本研究结果显示,2001年拉咱市恶性疟原虫样本 *pfcr1* 基因 K76T 野生型也较高(20%),突变也以三重突变型(CVIET)为主(75%),二重突变型(SVMNT)占 5%;2007年三重突变型(CVIET 和 CVIDT)分别占 95%和 5%,但2012年三重突变型(CVIET)比例下降至 77.5%,可能与当地2012年以来规范使用抗疟药物有关。在缅甸勐冒县,2008年 Zeng 等^[27]报道该地区恶性疟原虫 *pfcr1* 基因 C72S、M74I、N75E 和 K76T 突变率分别为 29%、83.9%、80.6%和 100%,与本研究2009年当地 *pfcr1* 基因 C72S、M74I、N75E/D 和 K76T 突变率分别为 30%、67.5%、70%和 97.5%基本相似,且以三重突变型(CVIET)为主,同时存在双重突变型(SVMNT 和 CVIDK)。上述地区恶性疟原虫 *pfcr1* 基因 K76T 突变率依然较高,氯喹抗性仍然较高,未出现类似非洲马拉维国家氯喹敏感性恢复的现象^[28],可能与中缅边境地区恶性疟原虫 *pfcr1* 基因以三重突变型(CVIET)

为主有关。

杨亚明等^[22]报道1999年云南省西双版纳州恶性疟原虫 *pfmdr1* 基因的 N86Y 突变率为 34.6%;官亚宜等^[29]发现云南省恶性疟原虫 *pfmdr1* 基因 N86Y 突变率为 46.5%;本研究结果发现云南西双版纳地区 *pfmdr1* 基因不仅有 N86Y 和 Y184F 突变,与恶性疟原虫青蒿素敏感性降低相关的 F1226Y 突变^[30]。在缅甸拉咱市,2007-2009年 Wang 等^[25]报道 *pfmdr1* 基因 Y184F 突变率为 27.5%,而 N86Y 和 N1042D 突变率相对较低(分别为 2%和 7.8%);2007年 Bai 等^[26] *pfmdr1* 基因 N86Y 突变率为 4.8%,但 Y184F 突变率由2007年的 28.6%升高至2008年的 43.9%,2009年、2010年和2012年分别下降为 31.8%、10%和 7.7%,与本研究拉咱市结果2012年 *pfmdr1* 基因 Y184F 突变比例较高(37.5%)有所差异。在缅甸勐冒县,Zeng 等^[27]报道了2008年 *pfmdr1* 检测到 N86Y(22.6%)、Y184F(9.7%)和 G130K(9.7%)突变,与本研究结果基本相似(Y184F 和 N86Y 突变率分别为 27.5%和 25%)。

综上所述,中缅边境恶性疟原虫 *pfcr1* 基因均以三重突变型(CVIET)为主,氯喹抗性均较高,建议相关部门进一步加强恶性疟原虫抗性基因监测,为调整或制定当地的恶性疟治疗策略提供科学依据。

【参考文献】

- [1] WHO. World malaria report 2020:20 years of global progress and challenges[J]. World Health Organization,2020.
- [2] Hariantsuta T,Suntharasamai P,Viravan C. Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Thailand[J]. Lancet,1965,2(7414):657-660.
- [3] Sidhu AB,Verdier-Pinard D and Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr1* mutations[J]. Science,2002(298):210-213.
- [4] Lakshmanan V,Bray PG,Verdier-Pinard D,et al. A critical role

- for *PfCRT* K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance[J]. *EMBO J*, 2005(24):2294-2305.
- [5] Fidock DA, Nomura T, Talley AK, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *PfCRT* and evidence for their role in chloroquine resistance[J]. *Mol Cell*, 2000(6):861-871.
- [6] Bray PG, Martin RE, Tilley L, et al. Defining the role of *PfCRT* in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance[J]. *Mol Microbiol*, 2005, 56(2):323-33.
- [7] Mehlotra RK, Mattera G, Bockarie MJ, et al. Discordant patterns of genetic variation at two chloroquine resistance loci in worldwide populations of the malaria parasites *Plasmodium falciparum*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(6):2212-2222.
- [8] Takahashi N, Tanabe K, Tsukahara T, et al. Large-scale survey for novel genotypes of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance gene *pfcr1*[J]. *Malar J*, 2012(11):92.
- [9] Dittrich S, Alifrangis M, Stohrer JM, et al. *Falciparum* malaria in the north of Laos: the occurrence and implications of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr1*) gene haplotype SVMNT[J]. *Trop Med Int Health*, 2005, 10(12):1267-1270.
- [10] Lim P, Chy S, Arey F, et al. *pfcr1* polymorphism and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* strains isolated in Cambodia[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(1):87-94.
- [11] Alifrangis M, Dalgaard MB, Lusingu JP, et al. Occurrence of the Southeast Asian/South American SVMNT haplotype of the chloroquine resistance transporter gene in *Plasmodium falciparum* in Tanzania[J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(12):1738-1741.
- [12] Ibraheem ZO, Abd Majid R, Noor SM, et al. Role of Different *Pfcr1* and *Pfmdr1* Mutations in Conferring Resistance to Antimalarial Drugs in *Plasmodium falciparum* [J]. *Malar Res Treat*, 2014, (2014):950424.
- [13] Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, et al. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2000(108):13-23.
- [14] Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. *Pgh1* modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*[J]. *Nature*, 2000(403):906-909.
- [15] Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, et al. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003(47):2418-2423.
- [16] Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, et al. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*[J]. *Nature*, 1990(345):255-258.
- [17] Huang F, Tang L, Yang H, et al. Molecular epidemiology of drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* in Yunnan Province, China[J]. *Malar J*, 2012(11):243.
- [18] Zhang GQ, Guan YY, Zheng B, et al. Molecular assessment of *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs in China[J]. *Trop Med Int Health*, 2009, 14(10):1266-1271.
- [19] Sutars KD, Gupta B, Ranjit M. Sequence analysis of coding DNA fragments of *pfcr1* and *pfmdr1* genes in *Plasmodium falciparum* isolates from Odisha, India[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011, 106(1):78-84.
- [20] 王安平, 高琪, 顾亚萍, 等. 海南恶性疟原虫 *pfcr1* 等位基因多态性的单体型研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2007, 25(2):106-113.
- [21] Xu C, Wei QK, Yin K, et al. Surveillance of Antimalarial Resistance *Pfcr1*, *Pfmdr1*, and *Pfelch* 13 Polymorphisms in African *Plasmodium falciparum* imported to Shandong Province, China[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):12951.
- [22] 杨亚明, 张再兴, 董莹, 等. 云南省现场恶性疟原虫 3 个抗药性基因点突变特征[J]. *中国热带医学*, 2004, 4(1):7-9.
- [23] Yang Z, Zhang Z, Sun X, et al. Molecular analysis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Yunnan Province, China[J]. *Trop Med Int Health*, 2007, 12(9):1051-1060.
- [24] 朱垚吉, 陈梦妮, 徐艳春, 等. 云南省恶性疟原虫 *Pfcr1* 基因 exon2 区 72~76 编码序列多态性的分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2016, 34(3):227-232.
- [25] Wang Z, Parker D, Meng H, et al. *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* from China-Myanmar Border Area to major ACT drugs and polymorphisms in potential target genes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e30927.
- [26] Bai Y, Zhang J, Geng J, et al. Longitudinal surveillance of drug resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from the China-Myanmar border reveals persistent circulation of multidrug resistant parasites[J]. *Drugs and Drug Resistance*, 2018(8):320-328.
- [27] Zeng WL, Bai Y, Wang ML, et al. Significant divergence in sensitivity to antimalarial drugs between neighboring *Plasmodium falciparum* populations along the Eastern Border of Myanmar [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(2):e01689-16.
- [28] Frosch AE, Laufer MK, Mathanga DP, et al. Return of widespread chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* to Malawi [J]. *J Infect Dis*, 2014(210):1110-1114.
- [29] 官亚宜, 张国庆, 胡铃, 等. 我国恶性疟原虫 *Pfcr1* 和 *Pfmdr1* 基因多态性及与氯喹敏感性关系的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2009, 4(1):27-31.
- [30] Veiga MI, Ferreira PE, Jornhagen L, et al. Novel polymorphisms in *Plasmodium falciparum* ABC transporter genes are associated with major ACT antimalarial drug resistance[J]. *PLoS One*, 2011(6):e20212.