

DOI:10.13350/j.cjpb.220521

• “一带一路”专题研究 •

# 中缅边境地区恶性疟原虫 dhfr 和 dhps 基因多态性分析\*

叶升玉<sup>1,2</sup>, 李春富<sup>1</sup>, 唐烨榕<sup>1</sup>, 叶润<sup>2\*\*</sup>, 周红宁<sup>1\*\*</sup>

(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 dhfr 和 dhps 基因多态性。方法 收集 2001-2012 年中缅边境中国云南西双版纳州景洪市、缅甸克钦邦拉咱市和缅甸掸邦第二特区勐冒县恶性疟患者滤纸血样本 175 份, 采用巢式 PCR 法分别扩增恶性疟原虫二氢叶酸还原酶基因 (*Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase gene, *pf dhfr*) 第 51-164 位点片段和二氢蝶酸合成酶基因 (*Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase gene, *pf dhps*) 第 436-613 位点片段, 并对扩增产物进行测序分析。结果 共检测到恶性疟原虫 *pf dhfr* 基因 4 个突变位点 (N51I, C59R, S108N 和 I164L) 和 7 种基因型, 3 个地区 *pf dhfr* 基因均存在四重突变型 (IRNL), 其中云南景洪市 2001 年和 2006 年 IRNL 分别占 26.7% 和 28%, 缅甸拉咱市 2001 年、2007 年和 2012 年分别占 35%、40% 和 60%, 缅甸勐冒县 2009 年占比为 40%。*pf dhfr* 基因野生型, 云南景洪市 2001 年占比 23.3%, 2006 年未检测到野生型, 以二重突变型 (NRNI) 为主, 占 44%; 缅甸拉咱市 2001 年占比 10%, 单重突变型率 (NRSI) 5%, 双重突变型率 (IRSI, NRNI) 10%, 三重突变型率 (IRNI, NRNL) 40%, 2007 年除四重突变外 (40%), 三重突变型率 (NRNL) 和二重突变型率 (NRNI) 均为 30%, 2012 年三重突变以 IRNI 型为主占 25%; 缅甸勐冒县 2009 年 *pf dhfr* 基因野生型比例较高, 占 45%, 三重突变型率 (NRNL 和 IRNI) 占 12.5%。共检测到 *pf dhps* 基因 4 个突变位点 (S436A/F, A437G, K540E/N 和 A581G) 和 14 种基因型, 其中云南景洪市 2001 年样本中 *pf dhps* 基因未发现三重突变, 以二重突变型 (SAEG) 为主, 占 53.3%, 2006 年出现了三重突变型 (FAEG), 占 8%, 单突变型率 (AAKA) 40%; 缅甸拉咱市 *pf dhps* 基因三重突变型率 (FAEG) 2001 年、2007 年和 2012 年分别为 5%、35% 和 37.5%, 单突变型 (SGKA, SAEA, SAKG) 仅在 2001 年样本中检测到, 占比 30%, 2007 年 (SAEG, FGKA, FAEA, AAEA) 及 2012 年 (SAEG, FAKG, FGKA, AAEA) 中双重突变型率分别占 60% 和 55%; 缅甸勐冒县 2009 年样本中 *pf dhps* 基因三重突变型率 (FAEG) 为 27.5%, 无野生型及单突变型, 二重突变型率 (AAEA 和 FGKA) 为 50%。结论 中缅边境 3 个地区 *pf dhfr* 基因和 *pf dhps* 基因突变程度均较高, 提示该地区恶性疟原虫对磺胺多辛-乙胺嘧啶药物存在抗性, 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; *pf dhfr* 基因; *pf dhps* 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)05-0595-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 May;17(5):595-600.]

## Polymorphisms of *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps gene in China-Myanmar border

YE Sheng-yu<sup>1,2</sup>, LI Chung-fu<sup>1</sup>, TANG Ye-rong<sup>1</sup>, YE Run<sup>2</sup>, ZHOU Hong-ning<sup>1</sup> (1. Key Laboratory of Insect-borne Infectious Diseases Control in Yunnan Province & Key Technology Innovation Team for Prevention and Control of Insect Vectors in Yunnan Province of Yunnan Institute of Parasitic Diseases, Pu'er, Yunnan 665000, China; 2. Department of Tropical Diseases, Navy Medical University)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To analyze the polymorphisms of *dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falciparum* in China-Myanmar border. **Methods** Totally 175 *Plasmodium 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* dihydrofolate reductase gene (*pf dhfr*) (positions 51 to 164) and *Plasmodium falciparum* dihydropteroic synthase (*pf dhps*) gene (positions 436 to 613) were amplified by Nested PCR, and then products were sequenced and analyzed. **Results** Four mutation sites (N51I, C59R, S108N and I164L) and seven haplotypes were detected in *pf dhfr* gene, of which the quadruple mutants (IRNL) were the major haplotype in above three areas. The percentage of haplotype (IRNL) was 26.7% in 2001 and 28% in 2006 in Jinghong City. In Lazan City, the percentage of haplotype (IRNL) were 35%, 40% and 60% in 2001, 2007 and 2012, respectively, and it accounted for 40% in Mengmao County in 2009. For

\* **【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

*pfdhfr* gene wild type, the proportion of the wild type was 23.3% in 2001 in Jinghong City. In 2006, no wild type was detected, while the double mutants (NRNI) accounted for 44%. In Lazan City, the proportions of wild type was 10%. Single mutants (NRSI), double mutants (IRSI, NRNI) and triple mutants (IRNI, NRNL) were 5%, 10% and 40% in 2001, respectively. Except for quadruple mutations (40%) in 2007, the triple mutants (NRNL) and double mutants (NRNI) each accounted for 30%. However, the major triple mutants were IRNI, which accounted for 25% in 2012. In Mengmao County, the proportion of wild-type in 2009 was 45%, and the triple mutants (NRNL, IRNI) accounted for 12.5%. Totally four mutation sites (S436A/F, A437G, K540E/N and A581G) and fourteen haplotypes were detected in *pfdhps* gene. In Jinghong City, no triple mutants was detected in 2001, the proportion of double mutants (SAEG) was 53.3%. While the proportions of triple mutants (FAEG) and single mutants (AAKA) were 8% and 40% in 2006, respectively. In Lazan City, the rates of triple mutants (FAEG) of *pfdhps* gene were 5%, 35% and 37.5% in 2001, 2007 and 2012, respectively. In addition, single mutants (SGKA, SAEA, SAKG) were only detected in 2001, with the proportions of 30%. And double mutants accounted for 60% in 2007 (SAEG, FGKA, FAEA, AAEA) and 55% in 2012 (SAEG, FAKG, FGKA, AAEA). In Mengmao County, the proportion of triple mutants (FAEG) of *pfdhps* gene was 27.5%, double mutants (AAEA, FGKA) accounted for 50%, while no wild type and single mutants were found.

**Conclusion** The high mutation rates of *pfdhfr* and *pfdhps* genes suggest that the *P. falciparum* parasites were high resistant to SP drugs in three areas along the China-Myanmar border, which also provide guidance for the treatment of *Plasmodium falciparum* in China-Myanmar border.

**【Key words】** *Plasmodium falciparum*; *pfdhfr* gene; *pfdhps* gene; Polymorphism; China-Myanmar border

据世界卫生组织 2021 年全球疟疾报告统计, 2020 年全球疟疾感染人数约 2.41 亿, 死亡约 62.7 万人, 特别是恶性疟原虫耐药性问题是目前疟疾控制与消除的主要挑战<sup>[1]</sup>。恶性疟原虫二氢叶酸还原酶基因 (*Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase gene, *pfdhfr*) 突变 (C50R、N51I、C59R、S108N 和 I164L) 可导致恶性疟原虫对乙胺嘧啶产生耐药性, 其中 S108N 是产生高度耐药性最关键的位点, 其余位点的突变能起增强抗性的作用<sup>[2-5]</sup>。同样, 恶性疟原虫二氢蝶酸合成酶基因 (*Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase gene, *pfdhps*) 突变 (S436A、A437G、K540E、A581G 和 A613S) 与磺胺多辛耐药性有关, 其中 A437G 是药物抗性产生最关键的突变, 且与 *pfdhfr* 类似, 其耐药性程度会随着 *pfdhps* 基因突变位点数量的增多而增大<sup>[6-8]</sup>。1970 年发现泰柬边境恶性疟原虫对磺胺多辛-乙胺嘧啶 (SP) 药物产生抗性<sup>[9]</sup>, 随后东南亚地区也出现类似问题, 如 1991 年时在泰国使用 SP 治疗恶性疟原虫失败率约为 100%, 在缅甸北部和西部地区 SP 治疗恶性疟原虫失败率达 100% 和 67%<sup>[10-12]</sup>。本研究拟通过检测中缅边境地区恶性疟原虫 *pfdhfr* 和 *pfdhps* 基因突变特征, 为当地恶性疟防治提供理论依据。

## 材料与方 法

### 1 材料

**1.1 血样采集** 共收集恶性疟原虫样本 175 份, 分别采集于云南省西双版纳州景洪市 (下简称云南景洪), 缅甸克钦邦拉咱市 (下简称缅甸拉咱) 以及掸邦第二特区勐冒县 (下简称缅甸勐冒) 3 个地区 (表 1)。

表 1 恶性疟原虫样本 (滤纸血) 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

所有样本均获得患者知情同意, 并经镜检确定为恶性疟原虫感染, 采集 0.6 mL 静脉血制作滤纸血样本, 晾干后置于带干燥剂的塑料封口袋中, -20 °C 保存。

**1.2 主要试剂** QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; KOD Plus Neo 高保真 PCR 扩增酶购自上海硕盟生物有限公司; 琼脂糖粉及 Gold view DNA 染料购自上海赛百盛基因技术有限公司。

**1.3 主要仪器** Micro CL 17 台式离心机购于美国 Thermo 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; MP200A 电子天平购于上海良平仪器仪表有限公司) 等。

### 2 方法

**2.1 疟原虫基因组提取** 取直径为 5 mm 的滤纸血片 3-4 个, 用 QIAamp DNA Mini Kit 提取试剂盒进行基因组 DNA 抽提, -20 °C 保存备用。

**2.2 *pfdhfr* 和 *pfdhps* 基因巢式 PCR 扩增**

**2.2.1 引物设计与合成** 参考文献<sup>[13-14]</sup>中的引物序列,分别扩增 *pfdhfr* 基因第 51、59、108 和 164 位点片段, *pfdhps* 基因第 436、437、540、581 和 613 位点片段。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 2。

表 2 *pfdhfr* 和 *pfdhps* 基因扩增引物  
Table 2 Primers for amplification of *pfdhfr* and *pfdhps* gene samples

引物名称 Primer	序列(5' - 3') Sequences(5' - 3')	位点 Positions
<i>pfdhfr</i> OF	TTTATGATGGAACAAGTCTGC	第 51-164 位点
<i>pfdhfr</i> OR	CTAGTATATACATCGCTAACA	
<i>pfdhfr</i> IF	TGATGGAACAAGTCTGCGACGT	
<i>pfdhfr</i> IR	CTGGAAAAATACATCACATTTCATATG	
<i>pfdhps</i> OF	GATTCTTTTTCAGATGGAGG	第 436-613 位点
<i>pfdhps</i> OR	TTCCTCATGTAATTCATCTGA	
<i>pfdhps</i> IF	AACCTAAACGTGCTGTTCAA	
<i>pfdhps</i> IR	AATTGTGTGATTGTCCACAA	

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 巢式 PCR 扩增** 以疟原虫基因组 DNA 为模板进行第一轮 PCR 扩增。反应体系为 15  $\mu$ L:10 $\times$  PCR Buffer 1.5  $\mu$ L, dNTPs (2 mmol/L) 1.5  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub> (25 mmol/L) 0.6  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.4  $\mu$ L (10 mmol/L), KOD-Plus-Neo (1.6 mg/mL) 0.2  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足 15  $\mu$ L; 第二轮 PCR 反应取第一轮产物 1  $\mu$ 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 扩增产物测序** 取 *pfdhfr* 和 *pfdhps* 基因第二轮 PCR 产物, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后测序, 采用 Mega 7.0 软件分析比对位点突变情况。

**2.2.4 统计学分析** 将样本信息、*pfdhfr* 和 *pfdhps* 基因片段的 SNP 变异结果等用 Microsoft Office Excel 2007 软件建立数据库, 并用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。采用  $\chi^2$  检验进行 3 个地区间的 *pfdhfr* 和 *pfdhps* 基因野生型占比或基因突变率分析,  $\chi^2$  应用条件不满足时采用 Fisher 确切概率法,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 结 果

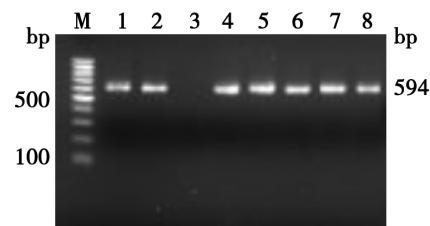
### 1 *pfdhfr* 及 *pfdhps* 基因 PCR 扩增

中缅边境 3 个地区采集的 175 份滤纸血样本, 两个基因片段的扩增阳性率均为 100%, *pfdhfr* 基因的目的片段大小约为 594 bp (图 1), *pfdhps* 基因的目的片段, 片段大小约为 711 bp (图 2)。

### 2 *pfdhfr* 基因突变分析

*pfdhfr* 基因在 51-164 位点上共检测到 4 个突变位点(N51I、C59R、S108N 和 I164L), 在这 4 个位点上

的基因型有 7 种 (图 3)。西双版纳州 *pfdhfr* 基因 2001 年存在基因型较多, 四重突变型 (IRNL) 占比为 26.7% (8/30), 三重突变型 (IRNI 和 NRNL) 占 33.3% (10/30), 二重突变型 (NRNI) 4 例, 单突变型 (NRSD) 1 例, 而 2006 年则以二重突变型 (NRNI) 为主, 占比为 44% (11/25), 三重突变型 (NRNL) 和四重突变型 (IRNL) 均为 28%; 拉咱市 *pfdhfr* 基因四重突变型 (IRNL) 由 2001 年的 35% (7/20) 上升至 2007 年的 40% (8/20) 和 2012 年的 60% (24/40), 2001 年 *pfdhfr* 基因型同样种类较多, 野生型占 10% (2/20), 单突变型 (NRSD) 占 5% (1/20), 双重突变型 (IRSI, NRNI) 占 10% (2/20), 三重突变型 (IRNI, NRNL) 占 40% (8/20), 2007 年除四重突变外, 仅有三重突变型 (NRNL) 和二重突变型 (NRNI), 分别占 30% (6/20) 和 30% (6/20), 2012 年三重突变以 IRNI 型为主, 占 25% (10/40); 勐冒县 2009 年野生型占 45% (18/40), 四重突变型 (IRNL) 占 40% (16/40), 三重突变型 (NRNL 和 IRNI) 占 12.5% (5/40), 二重突变型 (NRNI) 1 例 (图 3)。

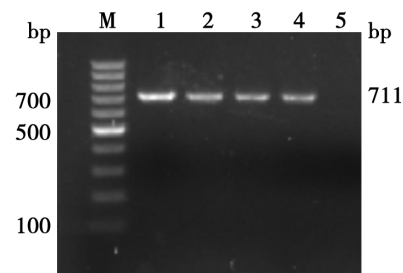


M DNA 标志物 (DL 100 bp) 1, 2, 4~8 恶性疟样本 3 阴性对照

图 1 *pfdhfr* 基因 PCR 扩增产物

M DL 100 bp DNA molecular marker 1, 2, 4-8 Samples 3 Negative control

Fig. 1 Nested PCR amplification product of *pfdhfr*



M DNA 标志物 (DL 100 bp) 1~4 恶性疟样本 5 阴性对照

图 2 *pfdhps* 基因 PCR 扩增产物

M DL 100 bp DNA molecular marker 1~4 Samples 5 Negative control

Fig. 2 Nested PCR amplification product of *pfdhps*

### 3 *pfdhps* 基因突变分析

*pfdhps* 基因在 436-613 位点上共找到 4 个突变位点 (S436A/F, A437G, K540E/N 和 A581G), 但是 4 个位点上的基因型种类非常多, 包括 4 种单突变型, 8

种双重突变型,1种三重突变型(图4),西双版纳2001年样本中 *pf dhps* 基因未发现三重突变,以二重突变型(SAEG)为主占53.3%(16/30),此外还有野生型占13.3%(4/30),单重突变型(AAKA, SAEA, SAKG)占23.3%(7/30),2006年出现了三重突变型(FAEG)占8%(2/25),双重突变型(SAEG, FGKA, FAEA, AAEA)占48%(12/25),单突变型(AAKA)占40%(10/25),野生型占4%(1/25)。拉咱市样本 *pf dhps* 基因三重突变型(FAEG)由2001年的5%(1/20)升高至2007年的35%(7/20)和2012年的37.5%(15/40),2001年还可检测到双重突变型(SAEG, SAEG, AANA, AAEA)占60%(12/20),单突变型(SGKA, SAEA, SAKG)占30%(6/20),2007年无单突变型,双重突变型(SAEG, FGKA, FAEA, AAEA)占60%(12/20),2012年同样无单突变型,双重突变型(SAEG, FAKG, FGKA, AAEA)占55%(22/40)。勐冒县2009年样本中三重突变型(FAEG)占27.5%(11/40),无野生型及单突变型,其中二重突变型(AAEA和FGKA)各占25%(10/40)(图4)。

#### 4 *pf dhfr* 及 *pf dhps* 基因突变位点统计学分析

上述地区恶性疟原虫 *pf dhfr* 基因的 N51I、C59R 和 S108N 3 个位点的突变率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 4); *pf dhps* 基因的 S436A/F、A437G 和 K540N 三个位点突变率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

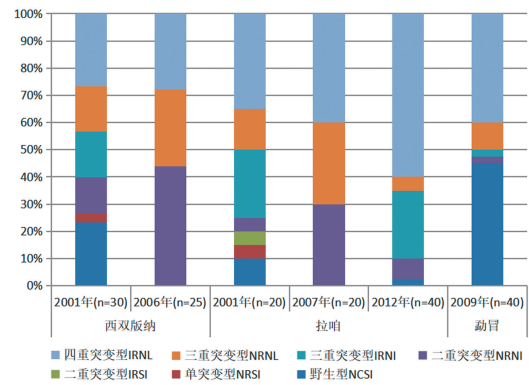


图3 中缅边境地区恶性疟原虫 *pf dhfr* 基因多态性  
Fig.3 Polymorphisms of *pf dhfr* gene of *P. falciparum* from China-Myanmar border

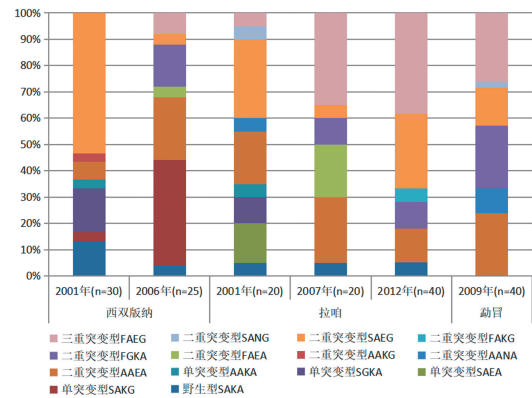


图4 中缅边境地区地区 *pf dhps* 基因多态性  
Fig.4 Polymorphism of *pf dhps* gene from China-Myanmar border

表3 中缅边境地区 *pf dhfr* 和 *pf dhps* 基因突变情况  
Table 3 *pf dhfr* and *pf dhps* gene mutations in the border areas of China-Myanmar

基因 Genes	突变 位点 Mutation	合计 (n = 175) Total		西双版纳 (n = 55) Xishuangbanna		拉咱 (n = 80) Lazan		勐冒 (n = 40) Mengmao		$\chi^2$ 值 $\chi^2$ value	P 值 P value
		突变样 本数 Mutation Samples	突变率 (%) Mutation rate(%)	突变样 本数 Mutation Samples	突变率 (%) Mutation rate(%)	突变样 本数 Mutation Samples	突变率 (%) Mutation rate(%)	突变样 本数 Mutation Samples	突变率 (%) Mutation rate(%)		
<i>pf dhfr</i>	N51I	92	52.6	20	36.4	55	68.8	17	42.5	15.820	<0.001
	C59R	147	84.0	48	87.3	77	96.3	22	55	34.400	<0.001
	S108N	144	82.3	47	85.5	75	93.8	22	55	28.023	<0.001
<i>pf dhps</i>	I164L	97	55.4	27	49.1	50	62.5	20	50	2.991	0.238
	S436A	49	28	20	36.4	15	18.8	14	35	6.276	0.044
	S436F	63	36	7	12.7	35	43.8	21	52.5	19.741	<0.001
	A437G	23	13.1	4	7.3	9	11.3	10	25	6.838	0.030
	K540E	121	69.1	33	60	61	76.3	27	67.5	4.099	0.133
	K540N	7	4	0	0	2	2.5	5	12.5	8.033	0.006
	A581G	85	48.6	21	38.2	45	56.3	19	47.5	4.283	0.121

### 讨论

1999年杨亚明等<sup>[15]</sup>报道了西双版纳州恶性疟原虫样本中, *pf dhfr* 基因在 51、108 和 164 位点有不同程度的突变,以 N51I(81.3%)和 S108N(94.3%)突变为主。本研究中2001年云南景洪可检测到23.3%的 *pf dhfr* 基因野生型,2006年均发生突变,N51I,

C59R, S108N 和 I164L 突变率分别为 28%、100%、100%和 56%。2009-2010年 Huang 等<sup>[16]</sup>检测了云南省腾冲和盈江县 *pf dhfr* 基因,发现 C59R 和 S108N 突变率分别高达 95.9%和 94.1%,N51I 和 I164L 的突变率分别为 60.8%和 75.3%,此外,四重突变型 (IRNL) 占 22.7%,三重突变型 (IRNI, IRSL, NRNL)



占 51.5%，双重突变型 (IRSI, NRNI, NRSL) 占 21.6%，上述结果说明 1999-2010 年中缅边境云南一侧的恶性疟原虫对乙胺嘧啶耐药性较高。在缅甸拉咱市，2003-2008 年 Zhang 等<sup>[17]</sup>报道 *pfdhfr* 基因以四重突变型 (IRNL) 为主，占 55%，其次三重突变型 (NRNL 和 IRNI) 和二重突变型 (NRNI) 分别占 38.3% 和 6.7%；2007-2012 年 Bai 等报道 *pfdhfr* 基因在 51、59、108 和 164 位点均发生突变且突变率逐年增高，其中 C59R 和 S108N 突变率在 2008 年以后均达到 100%，突变类型包括三重突变型 (IRNI 和 NRNL) 和四重突变型 (IRNL)，且呈逐年升高趋势，其中四重突变的比例 2012 年达 53.8%<sup>[18]</sup>；本研究中发现缅甸拉咱市恶性疟原虫在 2001 年时对乙胺嘧啶药物抗性已具有较高抗性，四重突变型 (IRNL) 比例占 35%，三重突变型 (IRNI) 占 25%，2007 和 2012 年四重突变型 (IRNL) 比例逐年增加，分别为 40% 和 60%；此外近年来的研究也报道，拉咱市 2015 年 *pfdhfr* (N51I、C59R、S108N 和 I164L) 突变率高，分别为 91.7%、100%、100% 和 100%，四重突变型 (IRNL) 为主 (91.7%)，三重突变型 (NRNL) 为 8.3%<sup>[19]</sup>。上述研究提示，缅甸拉咱市恶性疟原虫 *pfdhfr* 基因自 2001 年以来，在 51、59、108 和 164 位点突变率逐年增高，且向四重突变型 (IRNL) 转化。对于缅甸勐冒县，2008 年 *pfdhfr* 基因野生型比例为 29%，N51I、C59R、S108N 和 I164L 位点突变率分别为 29.0%、67.7%、71.1% 和 45.1%，四重突变型 (IRNL) 占 25.8%<sup>[20]</sup>。本研究结果显示，2009 年 *pfdhfr* 基因野生型占 45% (18/40)，N51I、C59R、S108N 和 I164L 位点突变率分别为 42.5%、55%、55% 和 52.5%，突变类型以四重突变型 (IRNL) 为主 (40%)，说明该地区恶性疟原虫对乙胺嘧啶高度抗性的四重突变型比例增加趋势。

对于以往恶性疟原虫 *pfdhps* 基因突变研究情况，在云南景洪鲜有报道，但本研究发现当地 *pfdhps* 基因的野生型比例从 2001 年的 13.3% 下降至 2006 年的 4%，且 2001 年以二重突变型 (SAEG) 为主占 53.3%，但 2006 年出现了三重突变 (FAEG) 占 8% (2/25)；2009-2010 年 Huang F 等<sup>[21]</sup>曾报道中缅边境地区的云南腾冲和盈江县 *pfdhps* 基因 S436A、A437G、K540E 和 A581G 突变率分别为 44.1%、82.8%、76.3%、53.8%，四重突变型 (AGEG) 占 28.0%，三重突变型 (AGKG) 占 8.6%，二重突变类型较多占 52.7%；此外，2014 年张智雯等<sup>[22]</sup>报道云南盈江县那邦镇 *pfdhps* 基因全部为三重突变型 (AGEA、SGNG 和 SGEG)，它们的突变比例分别为 50.0%、35.6% 和 14.4%，上述结果提示虽然中缅边境云南一侧早在

1980s 年代已经停止使用磺胺多辛药物，但目前恶性疟原虫对磺胺多辛仍有较高的耐药性。在缅甸拉咱市，2003-2008 年 Zhang 等<sup>[17]</sup>报道 *pfdhps* 基因以三重突变型 (AGNA、AGEA、SGEG 和 SGNG) 最为流行，占 90%，其中又以三重突变型 (AGEA) 为主占 50%；2007-2012 年拉咱市 *pfdhps* 基因在 436、437、540 和 581 位点均发生突变，其中 A437G 突变率均在 95% 以上，突变类型也以三重突变型为主，包括 (AGEA 和 SGEG)，其余二重突变型 (SGEA) 和四重突变型 (AGEG) 比例均较低<sup>[18]</sup>；本研究结果发现 2001-2012 年拉咱市三重突变型 (FAEG) 由 2001 年的 5% 升高至 2007 年的 35% 和 2012 年的 37.5%；近年来的研究发现，2015 年拉咱市 *pfdhps* 基因未发生 A437G 突变，S436A、K540E、K540N 和 A581G 突变率分别为 25.0%、50.0%、50.0% 和 75.0%，突变类型仅为二重突变型 (SGNG、SGEG、AGEA 和 AGNA)<sup>[19]</sup>，表明缅甸拉咱市恶性疟原虫对磺胺多辛仍有抗性，但 2012 年相比有下降的趋势。此外，2008 年缅甸勐冒县 *pfdhps* 基因 S436A、A437G、K540E/N 和 A581G 突变率分别为 38.7%、58.1%、54.8% 和 12.9%<sup>[20]</sup>，与本研究 2009 年结果 S436A/F、A437G、K540E/N 和 A581G 突变率分别为 87.5%、25%、80% 和 47.5% 相比，突变比例上升幅度较大，表明当地恶性疟原虫对磺胺多辛抗性程度较高。

综上所述，中缅边境地区的恶性疟原虫 *pfdhfr* 和 *pfdhps* 基因突变率较高，对 SP 仍有较高抗性，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] World Health Organization. World Malaria Report 2020 [R]. 2021, Geneva: WHO.
- [2] Lozovsky ER, Chookajorn T, Brown KM, et al. Stepwise acquisition of pyrimethamine resistance in the malaria parasite [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(29): 12025-12030.
- [3] Brown KM, Costanzo MS, Xu W, et al. Compensatory mutations restore fitness during the evolution of dihydrofolate reductase [J]. Mol Biol Evol, 2010, 27(12): 2682-2690.
- [4] Menegon M, Pearce RJ, Inojosa WO, et al. Monitoring for multidrug resistant *Plasmodium falciparum* isolates and analysis of pyrimethamine resistance evolution in Uige province, Angola [J]. Trop Med Int Health, 2009, 14(10): 1251-1257.
- [5] Mombo Ngoma G, Oyakhrome S, Ord R, et al. High prevalence of dhfr triple mutant and correlation with high rates of sulphadoxine-pyrimethamine treatment failures in vivo in Gabonese children [J]. Malar J, 2011(10): 123.
- [6] Wang P, Read M, Sims PF, et al. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization [J]. Mol Microbiol, 1997(23):

- 979-986.
- [7] Mita T, Venkatesan M, Ohashi J, et al. Limited geographical origin and global spread of sulfadoxine-resistant dhps alleles in *Plasmodium falciparum* populations[J]. J Infect Dis, 2011, 204(12):1980-1988.
- [8] Triglia T, Wang P, Sims P, et al. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria [J]. Embo J, 2014, 17(14):3807-3815.
- [9] Verdrager J. Epidemiology of the emergence and spread of drug-resistant, *falciparum* malaria in South-East Asia and Australasia [J]. J Trop Med Hyg, 1986(89):277-289.
- [10] Na-Bangchang K, Congpuong K. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand [J]. Tohoku J Exp Med, 2007, 211(2):99-113.
- [11] Smithuis FM, Monti F, Grundl M, et al. *Plasmodium falciparum*: sensitivity *in vivo* to chloroquine, pyrimethamine/sulfadoxine and mefloquine in western Myanmar [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1997, 91(4):468-472.
- [12] Smithuis F, Shahmanesh M, Kyaw MK, et al. Comparison of chloroquine, sulfadoxine/pyrimethamine, mefloquine and mefloquine-artesunate for the treatment of *falciparum* malaria in Kachin State, North Myanmar [J]. Trop Med Int Health, 2004, 9(11):1184-1190.
- [13] 杨成运, 李素华, 张雅兰, 等. 境外输入性恶性疟原虫药物抗性基因多态性分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(9):998-1001.
- [14] Omar AA Bamaga, Mohammed AK Mahdy, Yvonne ALL. Frequencies distribution of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase mutant alleles associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* population from Hadhramout Governorate, Yemen [J]. Malar J, 2015(14):516.
- [15] 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.
- [16] Huang F, Tang LH, Yang HL, et al. Molecular epidemiology of drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* in Yunnan Province, China [J]. Malar J, 2012(11):243.
- [17] Zhang Y, Yan H, Wei G, et al. Distinctive Origin and Spread Route of Pyrimethamine Resistant *Plasmodium falciparum* in Southern China [J]. Antim Agent Chem, 2014, 58(1):237.
- [18] 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 Drug Resist, 2018(8):320-328.
- [19] Zhao Y, Liu ZL, Myat TS, et al. Genetic variations associated with drug resistance markers in asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in myanmar [J]. Genes (Basel), 2019, 10(9):2-17.
- [20] 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]. Antimicrob Agent Chemo, 2017, 61(2):e01689-16.
- [21] Huang F, Tang LH, Yang HL, et al. Molecular epidemiology of drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* in Yunnan Province, China [J]. Malar J, 2012(11):243.
- [22] 张智雯, 黄嘉诚, 陈琳, 等. 中缅边境地区恶性疟原虫药物抗性基因多态性分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(12):1086-1088.

【收稿日期】 2022-02-25 【修回日期】 2022-05-10