

DOI:10.13350/j.cjpb.260101

• 论著 •

辽宁省输入性恶性疟原虫耐药性相关基因 Pfcrt 序列的多态性分析^{*}

王博,李鑫,雷露,王周超,孙英伟,于维君,毛玲玲^{**}

(辽宁省疾病预防控制中心感染与传染性疾病预防所,辽宁沈阳 110005)

【摘要】 目的 本研究旨在检测恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)氯喹抗性转运蛋白(Pfcrt)基因的多态性,分析其结构区域的序列变异,以期为掌握辽宁省恶性疟的耐药性情况进展和提供临床有效治疗方案提供科学的理论依据。

方法 收集了从2019-2021年期间的辽宁省输入性恶性疟疾病例患者的全血,采集了相关患者的流行病学信息。采用巢氏多重PCR的方法对恶性疟患者的全血样本进行Pfcrt耐药基因的扩增并且对其进行基因序列比对,对其目前输入性恶性疟原虫耐药基因的多态性进行详尽分析以及阐述其流行分布特征。本次共检测到18份病例患者的血样,扩增出的目的产物经测序获得了Pfcrt基因序列,并在基因库中与恶性疟原虫的标准株3D7(PF3D7-265519)序列进行Blast比对分析,使用Mega5.05软件对其进行了序列多态性的分析,并计算出序列之间的有效变异位点,遗传距离和氨基酸突变位点构成比。**结果** 本研究收集的辽宁省输入性恶性疟患者样本病例全部来自非洲,包括安哥拉、刚果布、刚果金、几内亚、尼日利亚、乌干达、喀麦隆。经过比对分析目前辽宁省恶性疟原虫Pfcrt基因存在着3种类型,即CVMNK型、CVIET型和CVMNT型。分析得出在突变型基因(CVIET)中的突变位点的发生主要在74、75、76位氨基酸,它的碱基突变分别为ATG→AAT、AAT→GAA和AAA→ACA,导致氨基酸的变化:M74I、N75E和K76T。这些突变类型与氯喹耐药性密切相关,尤其是K76T突变已被广泛认为是氯喹耐药性的重要标志。**结论** CVMNK型是最常见的Pfcrt基因类型,且氯喹敏感型仍占主导地位。研究结果提示,目前辽宁省氯喹依然可以作为恶性疟原虫有效的治疗选择。但CVIET型等突变型的存在也提示氯喹耐药性在部分地区可能逐渐发展,因此需要进一步加强对氯喹耐药性的监测和评估。尽管本文研究的样本较少,但结果为氯喹耐药性的分布和演变提供了有效信息,仍需范围内开展进一步的监测工作,以应对潜在的抗疟药物耐药性风险。

【关键词】 输入性恶性疟;耐药性;基因;多态性分析;辽宁省

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2026)01-0001-05

[Journal of Pathogen Biology. 2026 Jan.;21(01):1-5,12.]

Polymorphism analysis of pfcrt sequences related to drug resistance of imported *Plasmodium falciparum* in Liaoning Province

WANG Bo, LI Xin, LEI Lu, WANG Zhouchao, SUN Yingwei, YU Weijun, MAO Lingling (Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention of Infectious and Infectious Diseases, Liaoning 110005, China)^{***}

【Abstract】 **Objective** This study aims to detect the polymorphism of the chloroquine resistance transporter (Pfcrt) gene of *Plasmodium falciparum*, analyze the sequence variations in its structural regions, and provide a scientific theoretical basis for understanding the progress of drug resistance in falciparum malaria in Liaoning Province and offering effective clinical treatment plans. **Methods** Whole blood samples from patients with imported falciparum malaria in Liaoning Province from 2019 to 2021 were collected, and the epidemiological information of the relevant patients was gathered. The nested multiplex PCR method was used to amplify the Pfcrt drug resistance gene in the whole blood samples of falciparum malaria patients, and the gene sequences were compared. A detailed analysis of the polymorphism of the current imported falciparum malaria parasite drug resistance gene and an elaboration of its distribution characteristics were conducted. A total of 18 blood samples from patients were detected. The amplified target products were sequenced to obtain the Pfcrt gene sequence, which was then compared with the standard strain 3D7 (PF3D7-265519) sequence of *P. falciparum* in the gene bank by Blast analysis. Mega5.05 software was used to analyze the sequence polymorphism, and the effective variation sites, genetic distance and the composition ratio of amino acid mutation

* **【基金项目】** 国家科技重大专项艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治项目(No. 2017ZX10103007)。

** **【通信作者】** 毛玲玲, E-mail: maolinglingncdc@qq.com

【作者简介】 王博(1985-),女,辽宁铁岭人,本科,副主任技师,主要研究疟疾耐药分析。E-mail: wang2010bo@163.com

sites between the sequences were calculated. **Results** All the imported cases of falciparum malaria in Liaoning Province collected in this study originated from Africa, including Angola, Congo-Brazzaville, Congo-Kinshasa, Guinea, Nigeria, Uganda and Cameroon. After comparative analysis, it was found that there are three types of Pfcrt genes in falciparum malaria in Liaoning Province at present, namely CVMNK type, CVIET type and CVMNT type. The analysis shows that the mutation sites in the mutant gene (CVIET) mainly occur at amino acids 74, 75 and 76, with base mutations of ATG→AAT, AAT→GAA and AAA→ACA, resulting in amino acid changes of M74I, N75E and K76T. These mutation types are closely related to chloroquine resistance, especially the K76T mutation, which has been widely recognized as an important marker of chloroquine resistance. **Conclusion** The CVMNK type is the most common type of Pfcrt gene, and the chloroquine-sensitive type still dominates. The research results suggest that chloroquine can still be an effective treatment option for *P. falciparum* in Liaoning Province at present. However, the existence of mutant types such as CVIET also indicates that chloroquine resistance may gradually develop in some areas. Therefore, further monitoring and assessment of chloroquine resistance are needed. Although the sample size of this study is small, the results provide effective information on the distribution and evolution of chloroquine resistance. Further monitoring work should be carried out on a larger scale to deal with the potential risk of antimalarial drug resistance.

【Keywords】 Imported falciparum malaria; drug resistance; gene; polymorphism analysis; Liaoning Province

疟疾是由疟原虫通过雌性按蚊叮咬传播的严重传染病,是全球三大公共卫生问题之一。恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)引起的疟疾尤为危害健康,若治疗不及时可致死亡^[1-2],目前,药物治疗是主要的预防和治疗手段^[3],其中氯喹以其见效快、价格低廉、副作用小等优点,常作为治疗恶性疟疾的首选药物,但随着抗疟药物的广泛使用,恶性疟原虫逐渐表现出耐药性,并在全球范围内扩散,特别是在疟疾流行区,耐药性显著增加^[4-5],自20世纪60年代起,氯喹耐药性疟原虫已在多个地区出现,并逐渐蔓延^[6],导致目前几乎所有抗疟药物(氨基喹啉类、抑制叶酸合成类和青蒿素类)减效甚至于失效^[7]。特别是青蒿素类在东南亚和非洲一些国家和地区也被陆续观察到恶性疟原虫对其耐药^[3,6-7]。研究发现,恶性疟原虫氯喹抗性与其氯喹抗性转载体基因(Pfcrt)的突变密切相关。具体而言,Pfcrt基因在72-76等位基因的多态性变化与氯喹耐药性密切相关,这些突变使得治疗效果显著降低,增加了临床治疗的难度^[8-9],因此,监测抗疟药物的耐药性和相关基因变异,对推动全球疟疾消除具有重要意义。根据世界卫生组织(WHO)统计,2022年全球疟疾病例达2.49亿,较2021年增加了500万例^[10],并且跨境输入病例增多,尤其是在云南省等边境地区,存在疟原虫跨境传播的高风险^[11]。辽宁省的疟疾病例则主要源自中朝边境,长期潜伏的感染者未能及时发现,导致再传播的隐患^[12]。因此,对辽宁省输入性恶性疟原虫的耐药基因监测,尤其是对Pfcrt基因的研究,具有重要的科学、经济和社会意义。

本研究旨在分析辽宁省输入性恶性疟原虫Pfcrt基因的多态性,探讨耐药基因的发生与发展,掌握其分子流行病学传播规律,为疟疾的防控提供指导,并为临床治疗提供依据,为辽宁省的疟疾消除计划提供有力

支持。

材料与方法

1 材料

1.1 样本来源 本研究采集了2019-2021年期间来自市级疾病预防控制中心上送的恶性疟病例患者血样。每位患者提供2管3 mL外周抗凝血样本。所有血样在采集后立即进行处理和保存,以确保样本质量和稳定性。

1.2 主要仪器和试剂 核酸提取试剂盒(QIAamp DNA Mini Kit)为EZ12™(175038376)购自德国Qiagen公司,用于提取血液中的疟原虫DNA。聚合酶扩增试剂为宝生物TaKaRa Ex Taq酶(R001A)(日本),用于PCR扩增反应。PCR仪为东胜龙EDC-810(北京),用于进行热循环过程。稳压稳流电泳仪DYY-8B(北京),用于PCR扩增产物的电泳分离。凝胶成像系统为BIO-RAD Universal Hood II(美国),用于观察和拍摄琼脂糖凝胶上的扩增产物。琼脂糖为品牌SIGMA VETEC(西班牙),用于制备1.0%琼脂糖凝胶。电子天平METTLER TOLEPO AL104(北京),用于精确称量试剂。

1.3 疟原虫提取 从恶性疟患者采集200 μL抗凝血样本。利用QIAamp DNA Mini Kit进行DNA提取,按照试剂盒说明书操作,最终提取出100 μL纯化DNA样本。提取后的DNA被分装在1.5 mL离心管中,并立即存放于-40℃冷冻保存,直至进一步实验使用。

2 方法

2.1 巢氏PCR扩增

2.1.1 引物设计与合成 使用文献[13]中的恶性疟原虫Pfcrt基因序列引物,外套引物(OuterP1和

OuterP2)和内套引物(InnerP1 和 InnerP2)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列详见表1。

表1 巢式PCR检测恶性疟原虫Pfcrt基因的引物序列
Table 1 Primers of Pfcrt gene of *P. falciparum* by nested PCR

反应轮次	引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
第1轮	OuterP1	CCGTTAATAATAAATACACGCAG	537
	OuterP2	CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC	
第2轮	InnerP1	TGTGCTCATGTGTTTAAACTT	145
	InnerP2	CAAAAACCTATAGTTACCAATTTTG	

2.1.2 第一轮PCR扩增 第一轮PCR扩增使用外套引物 OuterP1 和 OuterP2,反应体系(最终体积 50 μ L)包括 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液、4 μ L dNTP(2.5 mmol/L)、2 μ L MgCl₂(25 mmol/L,最终浓度为 2.5 mmol/L)、0.5 μ L Taq 酶(5 U/ μ L)、1 μ L 的每对外套引物、2 μ L 提取的患者 DNA 模板以及 ddH₂O 补足至 50 μ L。PCR 反应条件设置为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,接着进行 25 个循环,循环条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒、58 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,反应结束后,降温至 4 $^{\circ}$ C 保存产物。

2.1.3 第二轮巢式PCR扩增 第二轮巢式PCR扩增使用内套引物 InnerP1 和 InnerP2 进行扩增,第1轮PCR的扩增产物(2 μ L)作为模板。反应体系(最终体积 50 μ L)包括 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液、4 μ L dNTP(2.5 mmol/L)、2 μ L MgCl₂(25 mmol/L,最终浓度为 2.5 mmol/L)、0.5 μ L Taq 酶(5 U/ μ L)、1 μ L 的每对内套引物、2 μ L 的第1轮PCR产物作为模板,剩余部分用 ddH₂O 补足至 50 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,接着进行 25 个循环:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、58 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,反应结束后降温至 4 $^{\circ}$ C 保存扩增产物。

2.2 扩增产物电泳分析 PCR 扩增产物使用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳分离。凝胶电泳缓冲液为 TAE 缓冲液,电泳条件为 100 V,运行 30~40 min。使用 BIO-RAD Universal Hood II 凝胶成像系统观察并拍摄目标扩增片段。

2.3 巢式PCR扩增产物的测序

2.3.1 测序操作 将第2轮PCR扩增产物(每个样本 2 μ L)送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行DNA测序。所有测序反应均使用标准 Sanger 测序方法进行。

2.3.2 序列比对与突变分析 测序结果通过 BioEdit 软件进行编辑,并与恶性疟原虫氯喹敏感株 3D7 的标准基因序列(GenBank:PF3D7-265519)进行同源性比对。使用 ClustalW 算法进行多序列比对,分析 Pfcrt 基因的突变类型和突变位置。特别关注氨基酸位置

72、73、74、75、76 的变异情况,分析这些变异与氯喹抗性的关联性。

结果

1 样本基本信息

本次研究对象为 2019-2021 年收集到的 18 例恶性疟患者,其中沈阳上报(9 例),大连(5 例),铁岭(2 例),锦州(1 例),丹东(1 例)。所有诊断的恶性病例均为来自非洲的输入性病例,其中来自安哥拉 8 例占比为(44%),刚果布 1 例(5%),刚果金 2 例(11%),几内亚 3 例(16%),贝宁 1 例(5%),尼日利亚 1 例(5%),乌干达 1 例(5%),喀麦隆 1 例(5%)。病例患者年龄分布范围在 26~56 岁之间,平均年龄为 45 岁,主要以男性为主,男性 16 例,女性 2 例。职业年龄分布为工人,务工人员和其他从业者。在这 18 份患者病例中根据数据分析比对可以得出,氯喹敏感型基因 CVMNK(野生型)14 株,抗氯喹抗性 CVIET(突变型)和 CVMNT 型 4 株,见表 2。

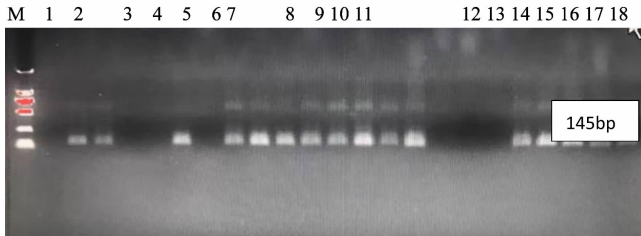
表2 2019—2021年辽宁省恶性疟病例信息
Table 2 Case information of falciparum malaria in Liaoning Province from 2019 to 2021

特征	病例数	构成比(%)	类型	
性别	男性	16	88.89	CVMNK(12,66.67%);CVIET(2,11.11%);CVMNT(2,11.11%)
	女性	2	11.11	CVMNK(2,11.11%)
	<30	2	11.11	CVMNK(2,11.11%)
年龄(岁)	≥ 31	16	88.89	CVMNK(12,66.67%);CVIET(2,11.11%);CVMNT(2,11.11%)
	职业	工人	8	44.44
其他		10	66.66	CVMNK(8,44.44%);CVIET(1,5.55%);CVMNT(1,5.55%)
感染地	安哥拉	8	44.44	CVMNK(6,33.33%);CVIET(1,5.55%);CVMNT(1,5.55%)
	刚果布	1	5.56	CVMNK(1,5.56%)
	刚果金	2	11.11	CVMNK(2,11.11%)
	几内亚	3	16.67	CVMNK(2,11.11%);CVIET(1,5.55%)
	贝宁	1	5.56	CVMNT(1,5.56%)
尼日利亚	1	5.56	CVMNK(1,5.56%)	
乌干达	1	5.56	CVMNK(1,5.56%)	
喀麦隆	1	5.56	CVMNK(1,5.56%)	

2 PCR 扩增结果

提取的 18 份患者血样 DNA 经巢式 PCR 扩增得出特异性片段,见图 1。目的片段大小为 145 bp。pfcrt 基因巢式 PCR 扩增产物测序峰图,测序结果见图 2。在 pfcrt 基因第 72-76 位区间的氨基酸位点可以观察到三种基因型,包括 CVMNK 野生型、CVIET 型和 CVMNT 型,百分比分别为 77.78%(14/18),11.11%(2/18)和 11.11%(2/18)。现有文献显示出

对于野生型 CVMNK 样本和突变型 CVIET 样本基因型可在非洲各区均有分布,而混合基因型的 CVM/IN/EK/T 的样本除了在东南亚地区没有发现,非洲各区均有。目前样本占比最多的为野生型 CVMNK,占 77.78%(14/18)。



M DNA 标志物 1~18 号 恶性疟样本
图 1 恶性疟患者血样 pfcr 基因巢氏 PCR 扩增结果

Fig. 1 Nested PCR amplification of pfcr gene in blood samples of patients with falciparum malaria

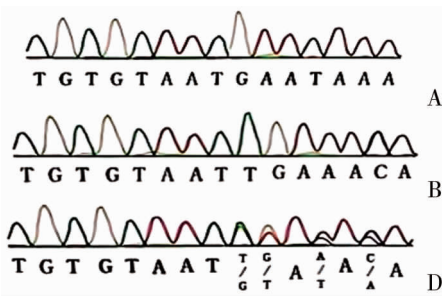


图 2 基因序列比对结果
Fig. 2 Gene sequence alignment results

3 序列比对分析

将这 18 份恶性疟患者血样 DNA 的巢氏 PCR 扩增产物经测序后,与恶性疟原虫氯喹敏感株 3D7 的序列进行比对分析,编码 72 和 73 位氨基酸的碱基未发生突变,均为 TGT 和 GTA。突变型基因中,编码 74、75 和 76 位氨基酸的碱基由 ATG、AAT 和 AAA 突变为 ATT、GAA 和 ACA,导致 74~76 位氨基酸的改变,为突变型(CVIET);混合型基因中,74~76 位氨基酸的碱基突变为 ATG/T、A/GAA/T 和 AA/CA,导致 74~76 位氨基酸的多样性,为混合型(CVM/I、N/E/D/K、T/K)。故 18 份患者血样中的 Pfcr 基因 72~76 位氨基酸的类型为 3 种,分别为 CVMNK、CVIET 和 CVMNT。

4 恶性疟原虫 Pfcr 基因序列比较

见表 3。见恶性疟原虫 Pfcr 基因 72~76 的结构区域氨基酸序列和标准株 PF3D7 的标准序列的氨基酸序列比较可以明显看出序号 2~15 号为 CVMNK,序号 16~17 号为 CVIET,序号 18~19 号为 CVMNT。

表 3 恶性疟原虫 Pfcr 基因 72-76 位结构区域氨基酸多态
Table 3 Amino acid polymorphism at positions 72 to 76 of Pfcr gene of *P. falciparum*

序号	分离株	氨基酸残基
1	PF3D7	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
2	2021-038	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
3	2021-021	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
4	2021-019	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
5	2021-017	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
6	2021-015	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
7	2021-016	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
8	2020-009	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
9	2020-001	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
10	2019-073	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
11	2019-072	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
12	2019-055	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
13	2019-056	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
14	2019-038	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
15	2019-034	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNKI FAKRTLNKIGNYSF
16	2019-048	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVIETIF AKRTLNKIGNYSF
17	2019-039	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVIETIF AKRTLNKIGNYSF
18	2021-012	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNTI FAKRTLNKIGNYSF
19	2019-057	CAHVFKLIFKEIKDNIFIYILSHIYLSVCVMNTI FAKRTLNKIGNYSF

5 18 例恶性疟与恶性疟原虫菌株 3D7 (GenBank 登录号:2655199) 进行同源性比对分析

CVMNK 的同源性高达 100%,CVIET 的同源性为 98%,CVMNT 的同源性为 99%,见图 3。CVMNK 距离最高,CVIET 和 CVMNT 型次之。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	100	97.2	98.8	95.9	93.9	97.3	98.0	94.6	97.3	95.9	98.8	95.9	98.0	93.9	97.3	95.9	95.2	95.9	1
2	29	100	95.8	93.8	95.1	95.1	94.4	98.6	95.1	95.1	95.8	94.4	95.8	92.4	96.5	93.1	95.1	93.8	2
3	21	37	100	97.3	93.9	98.0	98.6	96.6	98.6	97.3	98.6	97.3	97.3	94.6	98.6	95.2	96.6	97.3	3
4	35	51	35	100	92.2	96.0	96.0	93.9	98.0	96.7	97.3	92.2	96.0	92.2	98.0	92.8	94.7	91.5	4
5	57	07	65	78	100	94.0	94.7	95.9	95.2	94.0	95.2	91.5	92.0	90.2	95.2	90.2	91.3	90.2	5
6	29	60	07	50	87	100	97.3	95.3	98.0	96.7	96.6	95.3	96.0	94.7	99.3	94.0	95.3	95.3	6
7	28	44	14	56	7.1	2.1	100	93.9	99.3	95.7	99.3	95.4	94.7	90.1	98.0	94.7	94.0	93.4	7
8	29	00	37	50	14	66	43	100	94.6	93.9	95.2	94.6	94.6	91.9	95.9	91.9	92.6	93.9	8
9	21	37	07	35	65	14	07	37	100	97.3	99.3	98.0	95.9	94.6	98.6	94.6	96.6	95.9	9
10	28	29	21	41	50	29	28	29	21	100	97.3	94.0	94.7	92.0	99.3	94.0	94.0	92.7	10
11	21	37	07	35	65	14	07	37	00	21	100	97.3	98.0	93.9	97.3	94.6	95.2	95.2	11
12	14	22	14	21	50	07	14	22	07	14	07	100	93.3	90.2	97.3	87.8	93.3	95.7	12
13	00	43	28	34	64	50	42	43	28	42	28	21	100	92.0	98.6	94.7	94.7	93.3	13
14	43	81	66	72	100	7.1	80	80	7.3	57	74	58	72	100	95.9	89.5	92.7	92.2	14
15	21	29	07	28	57	14	14	29	07	07	07	07	28	58	100	94.6	96.6	97.3	15
16	57	83	94	85	117	87	114	81	94	93	94	87	63	93	87	100	96.0	91.0	16
17	36	51	57	42	87	74	7.1	5.1	64	42	65	50	42	72	42	70	100	95.3	17
18	36	45	14	42	72	29	28	44	21	28	21	14	42	80	14	110	65	100	18

图 3 辽宁省感染恶性疟原虫的 Pfcr 基因序列的遗传距离
Fig. 3 Genetic distance of Pfcr gene sequence of *P. falciparum* in Liaoning Province

讨 论

关于治疗恶性疟原虫过程中出现耐药性的问题一直都是目前全球关注的热点,是目前全球面临的亟待解决的攻克难题。了解并掌握耐药基因的多态性,针对恶性疟原虫耐药性进行实时监测,为临床治疗疟疾,合理的选择诊疗方案提供实验数据支撑。Pfcrt 基因是存在于恶性疟原虫上的第 7 号染色体中,研究资料显示第 72-76 编码突变导致的氨基酸改变,与抗氯喹的敏感性有关,并能增强上述功能^[13-14]。恶性疟疾通常有三种单倍型,即 CVMNK、CVIET 和 CVMNT^[15]。随着分子生物学 PCR 检测技术的逐渐成熟,它在恶性疟原虫抗性监测中被广泛的普及和应用^[16]。在 20 世纪 40 年代,氯喹常常被作为一线抗疟药物在全世界范围内治疗应用,但很快在 20 世纪 50 年代的中后期便开始出现了恶性疟原虫对氯喹产生了抗药性。恶性疟的主要流行区是在非洲,氯喹作为广谱抗疟药物在这里被普及应用。随着长时间的药物累及,恶性疟原虫开始了对抗疟药物氯喹产生了普遍的耐药性^[17]。针对这一现象的产生,此后,众多的疟疾研究学者便开展了恶性疟耐药基因多态性的分析与研究,并获得了多个与氯喹相关的恶性疟原虫抗药性分子标记^[18]。近些年,随着疟疾的耐药性问题越来越严重,越来越突出,我国也开展了关于恶性疟原虫的耐药性的监测工作。对抗疟药物特别是对恶性疟抗疟药物的研究与分析将对辽宁省今后输入性疟疾病例的管理和抗疟药物抗药性的使用情况提供十分重要的实验室数据信息支撑^[19-20]。本文就恶性疟原虫的耐药分子相关突变及其分子监测技术研究进展作一综述。

Pfcrt 是恶性疟原虫 7 号染色体的基因,编码疟原虫消化液泡中的跨膜蛋白,与亚洲、非洲和南美的氯喹抗性相关^[21]。为了监测抗疟药物的耐药性的发展状态,利用分子 PCR 技术监测疟疾流行的现状是十分必要的^[22]。通过分析研究对辽宁省 2019-2021 年 3 年期间的共 18 例恶性疟样本,在 pfcrt 基因第 72-76 位氨基酸变异位点可以观察到 3 种单倍型,包括 CVMNK 型、CVIET 型和 CVMNT 型。虽然本文的样本病例数不多,但是分别挑选的 19 年-21 年期间比较有代表性的恶性疟的病例患者,本文数据可以提示辽宁省目前的恶性疟治疗依然是以氯喹为首的,但是也逐渐开始出现了少量对氯喹耐药性株的这一现象的出现,为辽宁省今后在对恶性疟治疗上如何科学合理选择抗疟药物提供了参考意见。本研究对 2019-2021 年的 18 例输入性恶性疟病例中 Pfcrt 基因巢式 PCR 扩增后进行测序分析,结果分析显示,辽宁省目前存在的基因类型有 3 种即,野生型(敏感株)、突变型(抗性

株)和混合型(抗性株),从全国层面来看在云南缅甸边境地区,检测出 CVMNK、CVIET、SVMNT 和 CVMNT 等 4 种编码类型,且以 CVIET 最为常见。而在河南省恶性疟多态性分析当中,也是和辽宁一样存在着 3 种基因型,并且野生型(敏感株)CVMNK 占比比较大。辽宁省突变型基因(CVIET)的突变位点发生在 74、75、76 位氨基酸,碱基由 ATG、AAT 和 AAA 突变为 ATT、GAA 和 ACA,突变类型为 M74I、N75E 和 K76T。混合型基因(CVM/I、N/E/D/K、T/K)的突变亦发生在此 3 个氨基酸位点,碱基突变为 ATG/T、A/GAA/T 和 AA/CA,故氨基酸存在多样性,为混合型基因。所有病例血样的序列编码 72 和 73 位氨基酸的碱基均未发生突变,均为 TGT 和 GTA。目前,我国疟疾主要以输入性疟疾为主,且主要分布在有过非洲和中缅边境史的患者,虫种主要以恶性疟比较常见^[23],致死率最高,容易导致脑死亡,在我国输入性疟疾病例当中又居首位,因此,针对恶性疟原虫的耐药性基因分子的研究是目前指导临床用药的迫切需要。对于输入性病例疟疾耐药性分析特别是恶性疟是目前全球抗疟事业的热点,我国也及时的开展对恶性疟耐药基因的多态性分析,但是目前全国抗疟情况来看,缺乏持续性,有效性的动态性地基因分析,从而导致缺乏可靠的监测数据。因此,对于恶性疟抗疟要的动态性分析,不仅能及时有效的用药监测不仅给临床能够提供有效的诊断治疗,也可以提高整个社会乃至整个国家公共卫生的防护水平。因此,需要不断改进分子技术,以应对疟疾疫情的挑战。

【参考文献】

- [1] 范观珍,杨亚明. 按蚊及其肠道共生菌群间的相互作用对宿主媒介效能与生理功能影响研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2024,19(4):486-490.
- [2] 国家传染病医学中心. 疟疾诊疗指南[J]. 中华传染病杂志, 2022,40(8):449-456.
- [3] 王婧婷,关洪鑫,张丹丹,等. 抗疟疾药物研究进展[J]. 福建师范大学学报(自然科学版),2022,38(1):103-116.
- [4] Rani S, Devi J, Kumar B, et al. Organometallic analogs of chloroquine: Challenges and perspectives as anti-malarial agents [J]. Appl Organomet Chem, 2024, 38(9): e7613.
- [5] Li EZ, Nguyen TD, Tran TN, et al. Assessing emergence risk of double-resistant and triple-resistant genotypes of *Plasmodium falciparum* [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 1390.
- [6] Rosenthal PJ, Asua V, Bailey JA, et al. The emergence of artemisinin partial resistance in Africa: how do we respond [J]? Lancet Infect Dis, 2024, 24(9): e591-e600.
- [7] Ferreira LT, Cassiano GC, Alvarez LCS, et al. A novel 4-aminoquinoline chemotype with multistage antimalarial activity and lack of cross-resistance with PfCRT and PfMDR1 mutants [J]. PLoS Pathog, 2024, 20(10): e1012627.

- [16] 李华,曲会娟,孟鑫,等. 牙周炎促进动脉粥样硬化的机制[J]. 中国动脉硬化杂志,2024,32(2):178-184.
- [17] Ruan Q, Guan P, Qi W, et al. *Porphyromonas gingivalis* regulates atherosclerosis through an immune pathway [J]. Front Immunol,2023,14:1103592.
- [18] Freiherr Von Seckendorff A, Nomenjanahary MS, Labreuche J, et al. Periodontitis in ischemic stroke: impact of *Porphyromonas gingivalis* on thrombus composition and ischemic stroke outcomes [J]. Res Pract Thromb Haemost, 2024,8(1):102313.
- [19] 国思远,肖钰. 靶向肠道菌群及其代谢产物的动脉粥样硬化性疾病治疗[J]. 中国老年学杂志,2023,43(6):1531-1535.
- [20] Page MJ, Kell DB, Pretorius E. The role of lipopolysaccharide-induced cell signalling in chronic inflammation [J]. Chronic Stress (Thousand Oaks),2022,6(1):24705470221076390.
- [21] Pedersen MV, Renberg AFV, Christensen JK, et al. Lipopolysaccharide induced systemic inflammation and heart rate variability in a term newborn piglet model [J]. Pediatr Res,2025,97(1):138-144.
- [22] Marquet M, Zollkau J, Pastuschek J, et al. Evaluation of microbiome enrichment and host DNA depletion in human vaginal samples using Oxford Nanopore's adaptive sequencing [J]. Sci Rep,2022,12(1):4000.
- [23] Jansson JK, McClure R, Egbert RG. Soil microbiome engineering for sustainability in a changing environment [J]. Nat Biotechnol,2023,41(12):1716-1728.
- [24] Santillan E, Wuertz S. Microbiome assembly predictably shapes diversity across a range of disturbance frequencies in experimental microcosms [J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2022,8(1):41.
- [25] 孔庆慈,胡晓均,龚启梅. 种植体周病与代谢综合征关系的研究进展[J]. 中华口腔医学杂志,2023,58(1):75-80.
- [26] Akhi R, Lavrinienko A, Hakula M, et al. Oral microbiome diversity associates with carotid intima media thickness in middle-aged male subjects [J]. Commun Med (Lond),2025,5(1):66.
- [27] Tonelli A, Lumngwena EN, Ntusi NAB. The oral microbiome in the pathophysiology of cardiovascular disease [J]. Nat Rev Cardiol,2023,20(6):386-403.

【收稿日期】 2025-06-30 【修回日期】 2025-09-14

(上接 5 页)

- [8] Kim J, Tan YZ, Wicht KJ, et al. Struct. and drug resistance of the *Plasmodium falciparum* transporter PfCRT [J]. Nature, 2019, 576(7786):315-320.
- [9] Muhamad P, Phompradit P, Chaijaroenkul W, et al. Distribution patterns of molecular markers of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum* isolates on the Thai-Myanmar border during the periods of 1993-1998 and 2002-2008 [J]. BMC Genomics,2024,25(1):269.
- [10] How can we get malaria control back on track[J]? BMJ,2024, 385:1432.
- [11] 叶升玉,李春富,唐焯榕,等. 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[J]. 中国病原生物学杂志,2022,17(6):724-729.
- [12] 张昭玉,计星宇,温立海,等. 2013-2022年辽宁省沈阳市输入性疟疾流行特征分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2024,42(4):525-528.
- [13] 章太婵. 2018-2020年赤道几内亚 Bioko 岛恶性疟原虫耐药相关基因 PfCRT, PfMDR1, Pfubp1 和 Pfap2mu 的单核苷酸多态性分析 [D]. 广东医科大学,2024.
- [14] Bwire GM, Ngasala B, Mikomangwa WP, et al. Detection of mutations associated with artemisinin resistance at k13-propeller gene and a near complete return of chloroquine susceptible *Falciparum* malaria in Southeast of Tanzania[J]. Sci Rep,2020, 10(1):3500.
- [15] Ibekpobaoku AN, Oboh MA, Faal F, et al. Sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infections and multiple drug resistant single nucleotide polymorphic alleles in pregnant women from southwestern Nigeria[J]. BMC Res Notes,2024,17(1):129.
- [16] 朱辉银,李昱婷,李芸,等. 基于 AS-PCR 技术 pfdhps 耐药位点快速检测平台的建立及评价[J]. 中国病原生物学杂志,2023,18(8):899-904.
- [17] Fitri LE, Pawestri AR, Winaris N, et al. Antimalarial drug resistance: A brief history of its spread in Indonesia[J]. Drug Des Devel Ther,2023,17:1995-2010.
- [18] Tepper O, Peled I, Fastman Y, et al. FIT-PNAs as RNA-Sensing Probes for Drug-Resistant *Plasmodium falciparum* [J]. ACS Sens,2022,7(1):50-59.
- [19] 李莎,罗力涵,裴程程,等. 沈阳口岸输入性疟疾流行病学分析与防控措施探讨[J]. 中国口岸科学技术,2023,5(4):10-13.
- [20] 王晓中,于畅,谈波,等. 2015-2018年辽宁口岸输入性疟疾检出情况分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2018,41(6):402-405.
- [21] Foguim FT, Bogreau H, Gendrot M, et al. French national reference centre for imported malaria study group. Prevalence of mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter, PfCRT, and association with ex vivo susceptibility to common anti-malarial drugs against African *Plasmodium falciparum* isolates[J]. Malar J. 2020,19(1):201.
- [22] Labadie-Bracho MY, Adhin MR. Advocating for PCR-RFLP as molecular tool within malaria programs in low endemic areas and low resource settings[J]. PLoS Negl Trop Dis. 2023,17(11): e0011747.
- [23] 李中杰. 我国输入性疟疾流行特征与传播风险研究[D]. 中国疾病预防控制中心,2016.

【收稿日期】 2025-06-08 【修回日期】 2025-09-01