مجله دانشکده بهداشت وانستیتوتحقیقات بهداشتی
پاییز ۱۳۹٤، دوره ۱۳ ، شماره سوم ، صفحه ۷۱- ٦٥

مقاله پژوهشی

ایجاد بانک ذخیره ایزوله های مختلف پلاسمودیوم های فالسیپاروم و ویواکس جمع آوری شده از بیماران مبتلا به مالاریا به منظور بررسی های ژنتیکی و زیستی

افسانه متولی حقی: استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
مهدی ناطق پور: استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران- نویسنده رابط: nateghpourum@tums.ac.ir
مهدی محبعلی: استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
حمید آذریان: دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
یاور شریف زاده: دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، حشره شناسی پزشکی، دانشکده‌بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
لیلا فریور: کارشناس، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
هما حجاران: دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
موسی متولی حقی: دانشجوی دوره دکتری، گروه انگل شناسی پزشکی ، دانشگاه علوم‌پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۱۲ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/٦/۲٤**

چکیده

زمینه و هدف: ایجاد یک مخزن برای ذخیره سازی و حفظ انگل های مالاریا در شرایط حاضر که کشور درگیر برنامه های ملی حذف مالاریا می باشد می تواند امکان دسترسی به یک منبع غنی را به منظور دستیابی و استفاده بالقوه از ژن ها و پروتیئن های منتج از گونه های پلاسمودیوم های انسانی در اختیار پژوهشگران و محققان کشور قرار دهد. با توجه به کاهش روز افزون شمار مبتلایان به مالاریا در کشور لازم است هر چه سریعتر در گردآوری مجموعه پلاسمودیوم های موجود و بومی منطقه با شناسایی و ثبت ژن های متعلقه اقدام کرده تا زمینه برای مطالعات تکمیلی و کاربردی برای جامعه علمی کشور هموار گردد.

روش کار: پس از بیماریابی از مناطق اندمیک مالاریا، گسترش نازک و ضخیم تهیه ورنگ آمیزی گیمسا انجام گرفت. به منظور نگهداری طولانی مدت نمونه ها مونته و در آرشیو طبقه بندی شد. همچنین میزان ۲ میلی لیترخون از افراد آلوده جمع آوری و کرایوپرزرویشن ایزوله ها انجام شد. بنا به اقتضا و در نظر گرفتن بودجه تعدادی از ایزوله ها جهت تعیین شاخص ژنتیکی MSP-1 با استفاده از روشهای ملکولی PCR و PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. برای نمونه‌های پلاسمودیوم فالسیپاروم ذخیره شده تست حساسیت به دارو به طریقه درون تنی انجام و نتایج ثبت شد. جمع آوری و حفظ نمونه‌ها در شرایط انجماد فعالیت مداوم بانک بوده و ادامه خواهد داشت.

نتایج: دست آورد های حاصل از این طرح شامل ذخیره ۱۳۱ نمونه جمع آوری شده برای جامعه علمی کشورمی باشد که شامل ۱۰۹ ایزوله پلاسمودیوم ویواکس، ۱۹ ایزوله از پلاسمودیوم فالسیپاروم، و سه نمونه میکس بوده است. هر ایزوله ی حفظ شده دارای شناسنامه اختصاصی از جمله تعیین گونه، شمارش انگلی، ملیت، محل ابتلا می باشد. در طبقه بندی ژن MSP-1 برای نمونه‌های پلاسمودیوم ویواکس مجموع سه هاپلوتایپ مختلف شناسایی شد که بر اساس وزن باندهای ایجاد شده در اثر برش آنزیم PVU II به ترتیب شامل سه نوع هاپلوتایپ با فراوانی ۲۰/٦٪، ٤۱/۲٪ و بالاخره ۳۸/۲٪ بود. در مورد ایزوله های پلاسمودیوم فالسیپاروم حفظ شده تست درون تنی (in vivo) نسبت به داروی خط اول درمان در کشور (آرتسونات- فانسیدار)، حساسیت کلیه ایزوله ها را نشان داد.

نتیجه گیری: انجام این پروژه استفاده از ذخایر حاضر را در قالب کار روتین امکان پذیر ساخت که در صورت کلون سازی تا مدتها قابل بهره برداری برای محققین علمی کشور می باشد.

واژگان کلیدی: ذخیره، انگل های مالاریا، پلاسمودیوم فالسیپاروم، پلاسمودیوم ویواکس، ایران

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-13]

مقدمه

علی رغم کوشش های مداخله ای برای حذف مالاریا همچنان دو گونه انگل مالاریای انسانی پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم از ایران گزارش می شود. بر اساس آخرین تخمین سازمان بهداشت جهانی سالانه ۲۰۷ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا شده که ٦٢٧٠٠٠ مرگ را سبب می‌شود، که عمدتاً کودکان و زنان باردار هستند. اهمیت مبارزه با مالاریا باعث شده تا کاهش پنجاه درصدی موارد بیماری تا سال ۲۰۱۵ بعنوان یکی از اهداف هزاره توسط سازمان ملل اعلام گردد (WHO 2014). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۳ ایران در حال حاضر در مرحله حذف مالاریا قرار دارد.

روند ابتلا به مالاریا در ایران از سالها پیش همواره رو به کاهش بوده است. طبق گزارش دکتر ادریسیان پیرو برنامه‌های کنترل و حذف مالاریا شمار مبتلایان به مالاریا از ٩٦٣٤٠ مورد در سال۱۹۹۱ به ١٨٩٦٦ مورد در سال ۲۰۰۵ کاهش یافته است (Edrissian 2006). کاهش در شمار مبتلایان همچنان ادامه دارد تا سال های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ که به ترتیب به ٦١٢٢ و ۳۰۱۵ مورد بیماری و متعاقب آن در سالهای ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ به ترتیب به ١٦٠٠ و ١١٣٤ مورد رسیده است(CDC 2012). همچنین این موارد در سال ٢٠١٤ تعداد ۱۲۵۷ مورد بوده که از این تعداد ١١١٦ مورد ویواکس و ۱۱۷ مورد فالسیپارم و ۲۳ موردعفونت میکس گزارش شده است. از تعداد فوق ٦٤٣ نفر ایرانی و بقیه غیر ایرانی بوده اند. درصد انتقال محلی مالاریا نیز در سال مذکور ۲۰٪ بوده است (CDC 2014). گرچه اطلاعات فعلی در ایران حاکی از روند رو به کاهش تعداد مبتلایان به مالاریا می‌باشد، اما گزارش‌هایی مبنی بر بازگشت مجدد مالاریا در مناطقی از جهان که قبلا بیماری در آن نقاط حذف شده بود وجود دارد (Krogstad 1996) که اهمیت توجه و مراقبت را در مورد بیماری دو چندان می‌کند. در هرصورت با توجه به برنامه حذف مالاریا در کشور و کاهش مداوم شمار مبتلایان، تاسیس یک بانک برای حفظ و ذخیره سازی انگل های مالاریا و نتایج حاصل از بررسی‌های ملکولی و ثبت آن تحت عنوان ایزوله‌های موجود در کشور ضمن کمک به تکامل اطلاعات برای ساخت واکسن علیه انگل مذکور و ارتقائ روش‌های تشخیص سرولوژیک و بررسی‌های اپیدمیولوژیک در منطقه، می‌تواند کمک شایانی به ارزیابی برنامه های حذف و کنترل انگل در منطقه بنماید (Zakeri et al. 2006 a,b; Cui et al. 2003; Fenton et al. 1991; Giraldo et al. 2009; Santos-Ciminera et al. 2007).

با توجه به آنچه گذشت لازم است هر چه سریعتر در گردآوری مجموعه پلاسمودیوم‌های موجود در کشور با شناسایی و ثبت ژن های بومی منطقه اقدام کرده تا زمینه برای مطالعات تکمیلی و کاربردی برای جامعه علمی کشور هموار گردد. گردآوری ایزوله های مختلف در شرایطی که امکان حذف بیماری در منطقه می باشد امکان توسعه ی روش‌های دقیق را برای مطالعه سویه های متنوع فراهم می‌سازد. بدین ترتیب که مسئولین دست اندر کار با آگاهی از شاخصه های فنوتیپ و ژنوتیپ ایزوله های مختلف موجود در منطقه می-توانند علل بروز مجدد، اپیدمی های احتمالی، عود بیماری و حضور انگل‌های بومی در ناقلین را شناسایی نمایند و آمادگی لازم را برای رویارویی با هر مشکل احتمالی در منطقه داشته باشند. هدف از این پروژه ایجاد یک منبع ملی و مخزنی برای انگل‌های مالاریا و با تقسیم بندی ایزوله‌های حفظ شده پلاسمودیوم ویواکس بر اساس آلل های موجود از ژن MSP و تعیین حساسیت ایزوله‌های مختلف پلاسمودیوم فالسیپاروم، ارائه تکنیک های شناسایی به محققان و ذخیره مواد بیولوژیکی می باشد (Mehrizi et al. 2009; Trager and Jensen 1997; Parasite Biology 2007).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-13]

روش کار

ایزوله‌های مختلف *Plasmodium vivax* و *P. falciparum* از مناطق مختلف کشور که بیماری در آنجا مشاهده می شد جمع آوری و با حفظ زنجیره سرما به تهران منتقل می شدند. نحوه جمع آوری بدین صورت بود که پس از رنگ آمیزی گسترش های خونی و تایید مجدد جنس و گونه عامل عفونت، نمونه ها به سه روش مختلف یعنی تهیه لام خونی به طریقه گسترش نازک وضخیم، حفظ نمونه روی DNA Banking card (تهیه شده از شرکت زیست فناوری کوثر- ایران) بصورت پر شدن هر چهار حفره موجود در هر کارت برای یک بیمار و خشک نمودن آنها در محیط عاری از گرد و غبار یا حشرات و همچنین نگهداری خون حاوی ضد انعقاد EDTA به روش انجماد انجام شد. برای هر نمونه یک شناسنامه مطابق ذیل ایجاد گردید: پس از اختصاص دادن شماره و ثبت آن در دفاتر مخصوص، نام بیمار، سن و جنس بیمار، محل دقیق جداسازی، علائم بالینی، جنس و گونه انگل، شمارش انگلی، داروهای مورد استفاده، مقاومت به دارو بصورت پرسشنامه و یا تست انجام گرفته و در شناسنامه هر ایزوله بصورت مجزا گردآوری گردید.

از نقطه نظر رعایت ملاحظات اخلاقی در این مطالعه تنها یکبار خون گیری از بیمار به عمل آمد که جهت تشخیص بیماری وی ضروری است سپس با اخذ رضایت کتبی و آگاهانه از بیمار جهت مشارکت در مطالعه ضمن محرمانه بودن اطلاعات هویتی بیمار، حفظ نمونه خونی در بانک صورت گرفت. پس از انجام آزمایش‌های انگل شناسی چنانچه فرد مبتلا به بیماری مالاریا بود برای درمان به مسئولین درمانی منطقه معرفی می‌گردید.

بنا به اقتضا برای تعدادی از نمونه‌های *P.vivax* تعیین شاخص مارکر ژنتیکی به منظورطبقه بندی ایزوله جدا شده در بانک با استفاده از PCR و PCR-RFLP انجام شد. پس از استخراج DNA انگل با استفاده از کیت Bioneer AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit, Korea برطبق پروتکل کارخانه سازنده و سپس انجام PCR، قطعه ژنی متعلق به ناحیه Merozoite Surface Protein-1 با وزن ملکولی ۶۸۰ و استفاده از پرایمرهای PvMSP-1-F: CCTACTACTTGATGGTCCTC و PvMSP-1-R: CCTTCTGGTACAGCTCAATG تکثیر گردید (Nateghpour et al. 2010) و تست ملکولی PCR-RFLP با استفاده از آنزیم برش دهنده-Pvu II برای تعیین هاپلوتایپ های مختلف ژن MSP-1 انجام (Raza et al.) (2013 و نتایج به تفکیک نمونه ها ثبت شد. ضمنا برای حفظ هر چه بیشتر ایزوله‌ها، DNA استخراج شده نیز بر روی DNA Banking card قرار داده شده و در بانک ذخیره شد. برای نمونه های پلاسمودیوم فالسیپاروم ذخیره شده تست حساسیت به دارو به طریقه درون تنی انجام و نتایج ثبت گردید.

نتایج

جمعا ۱۳۱ نمونه طی یکسال (از مرداد۱۳۹۱ الی مرداد۱۳۹۲) شامل ۱۰۹ نمونه مربوط به *P.vivax*، ۱۹ نمونه *P.falciparum* و ۳ نمونه عفونت میکس در مجموعه مذکور گردآوری گردیدند. ۶۷ نمونه (۵۱٪) مربوط به اتباع ایرانی بود که از این تعداد پنج نفر افرادی بودند که به منظور تحصیل و یا کار به کشور هند مسافرت و سپس مراجعت کرده بودند. تعداد ۷ نمونه مربوط به ایرانیانی بود که به کشورهای آفریقایی مسافرت کرده بودند. بقیه نمونه ها از اتباع ایرانی بودند که ساکن مناطق اندمیک و یا سفر به آن مناطق داشته اند. ۶۰ نمونه(۴۶٪) مربوط به اتباع افغانی بود و بالاخره ۴ نفر(۳٪) از بیماران تبعه پاکستان بودند. هر نمونه با شناسنامه مخصوص به خود و تعیین هاپلوتایپ های ژنMSP-1 در بانک به ثبت رسید. طبق نتایج بدست آمده ژن MSP-1 در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-13]

ایزوله های جمع آوری شده دارای سه هاپلوتایپ متفاوت بود که از نظر وزنی نیز با هم اختلاف داشتند. وزن ملکولی این هاپلوتایپ ها در مطالعه حاضر بین ۷۵۰-۶۸۰ bp بود. هاپلو تایپ ۱ (Haplotype I) تحت اثر آنزیم برش دهنده PVU II شکستگی در طول ژن نشان نمی داد. نوع دوم (Haplotype II) تحت اثر آنزیم به دو قطعه ۲۰۰bp و ۵۵۰ bp و بالاخره هاپلوتایپ نوع ۳ که تحت تاثیر آنزیم دو قطعه ۲۰۰bp و ۴۸۰bp بوجود می‌آورد. میزان فراوانی این هاپلوتایپ ها به ترتیب شامل۲۰/۶٪ نمونه ها از نوع اول، ۴۱/۲٪ از نمونه ها نوع دوم و بالاخره ۳۸/۲٪ از نوع سوم بود (شکل۱). تمامی ایزوله‌های جمع آوری شده پلاسمودیوم فالسیپاروم از نظر تست حساسیت به دارو که به روش درون تنی (in vivo) انجام گرفت نسبت به خط اول درمان کشوری که در حال حاضر آرتسونات- فانسیدار می باشد حسایت نشان داد.

بحث

سازمان بهداشت جهانی با انجماد انگل های مالاریا و یا کلونسازی ژن‌های پلاسمودیوم ها، مبادرت به ایجاد یک بانک از انگل های مالاریا نموده است که می-تواند برای دانشمندان علاقه مند به تحقیق مثمر ثمر و ارزشمند باشد (WHO 1981). از سوی دیگر عدم دسترسی به مواد مرجع همواره یک مانع کلیدی در ارزیابی کیفیت آزمون‌های تشخیصی سریع مالاریا (RDTs) شناخته شده است. هدف WHO از بانک نمونه، پیدا کردن یک مجموعه مرجع در سطح جهان است که با استفاده از خون افراد آلوده به مالاریا دسترسی به منبعی برای ارزیابی تست‌های تشخیصی سریع مالاریا داشته باشد (WHO 1981). در کشور هند در سال ۱۹۹۲ بانکی به منظور نگهداری انگل های مالاریا برای مطالعات تخصصی تاسیس گردید که یک مخزن ملی از انواع انگل‌های مالاریا به حساب می آید. این بانک که با حمایت تعداد زیادی از سازمان‌های مختلف پایه ریزی شد دارای قابلیت کار بر روی جنبه‌های مختلف انگل‌های مالاریا می‌باشد و مواد بیولوژیکی انسانی و غیر انسانی / Plasmodia در رابطه با انگل مالاریا را حفظ و به عنوان بانک تحقیقاتی عرضه شده است (Parasite Biology 2007). در کشور ایران علی رغم اجرای برنامه حذف مالاریا و دستیابی به آن در سال ۱۴۰۴ متاسفانه هیچ گونه کوشش و فعالیتی جهت حفظ و نگهداری گونه های در حال انقراض پلاسمودیوم به منظور ثبت تاریخی واز طرف دیگربرای نیل به اهداف پژوهشی و مطالعات زیر ساختی به لحاظ ممانعت از بازگشت دوباره بیماری به کشور انجام نشده است. این پژوهش با هدف ایجاد بانک ذخیره زیستی و ژنتیکی ایزوله‌های مختلف پلاسمودیوم‌های انسانی (ویواکس و فالسیپاروم) جمع آوری شده از نقاط آندمیک ایران به منظور حصول به اهداف و فعالیت های آموزشی و پژوهشی پیرامون این انگل ها برنامه-ریزی گردید.

مشکلات و محدودیت‌های اجرایی که دست-اندرکاران طرح با آن مواجه بودند شامل: محدودیت در یافتن بیماران مبتلا به مالاریا بویژه *P.falciparum* بود که همواره سعی گردید با غربالگری تعداد بیشتری از افراد مشکوک، بر این مشکل غلبه شود. مشکل بعدی جمع آوری نمونه‌ها از مناطق آندمیک دور افتاده کشور بود که با هماهنگی با مراکز بهداشتی و درمانی در استان سیستان و بلوچستان این مشکل نیزتا حدودی مرتفع گردید.

دستاوردهای حاصل از این پژوهش شامل: تامین و ذخیره مواد بیولوژیکی برای جامعه علمی کشور، جمع آوری و نگهداری ایزوله‌های گونه‌های انسانی موجود در کشور تحت شرایط انجماد، راه اندازی روش‌های نوین آزمایشگاهی کشت *P.falciparum* و تشخیص گونه انگل‌های مرتبط بوده است. همچنین هر ایزوله حفظ شده دارای شناسنامه اختصاصی از جمله شمارش انگلی، تعیین شاخص‌های ژنتیکی با استفاده از روش‌های ملکولی PCR و -PCR

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-13]

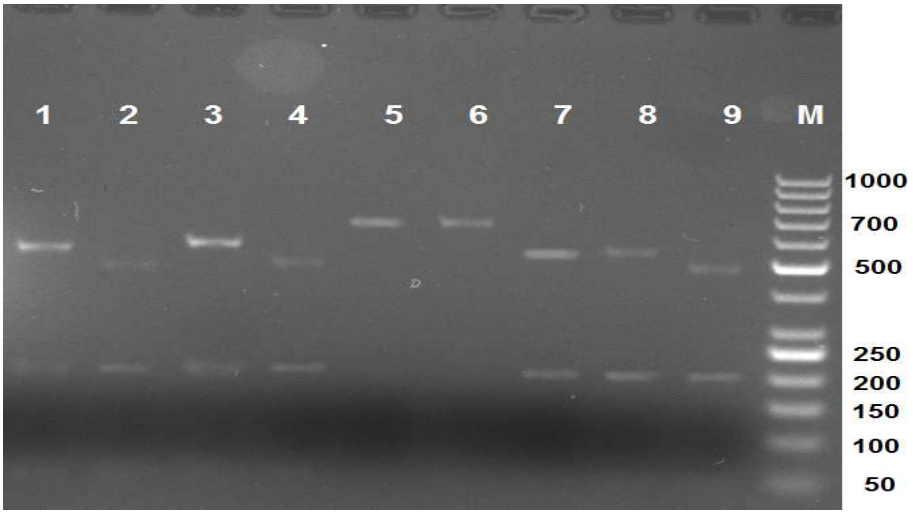
RFLP جهت مارکر ژنتیکی MSP-1 می باشد. جمع آوری و کرایو فعالیت مداوم بانک بوده و می باشد. طی یکسال گذشته پس از راه اندازی بانک مذکور برای حفظ و فرآوری بهینه ذخایر بانک و جمع آوری گونه های در حال انقراض پلاسمودیوم در کشور ضمن ارتباط با سایر مراکز بهداشتی در اقصی نقاط کشور از جمله مراکز بهداشتی در چابهار و سرباز کلیه نمونه های بومی درکشور و وارده از کشور های همسایه گردآوری و پس از بررسی حفظ و نگهداری شدند. همچنین با استفاده از نتایج حاصل از این طرح تعدادی دانشجویان فعال برای شناسایی هر چه بیشتر ژن‌های بومی نمونه‌های حفظ شده جذب گردید و استفاده از بانک ژنی را در قالب کار روتین امکان پذیر ساخت. در حال حاضر گونه‌های ضبط شده از لحاظ ژن‌های Apical membrane antigen-1، Duffy binding protein و Lactate dehydrogenase موردبررسی قرارگرفته اند.

نتیجه گیری

تاسیس بانک ذخیره انگل های مالاریا با تامین و ذخیره مواد بیولوژیکی می‌تواند امکان دسترسی به یک منبع غنی را به منظور دستیابی و استفاده بالقوه از ژن ها و پروتیئن‌های منتج از گونه‌های پلاسمودیوم‌های انسانی برای مدت‌های طولانی در اختیار پژوهشگران و محققان کشور قرار دهد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه طی قرارداد شماره ۹۱۳۳۳/م/۲٤۱ از حمایت‌های مالی موسسه ملی تحقیقات سلامت بهره مند شده است. بدینوسیله نویسندگان از مساعدت‌های آقایان آرش رشیدیان، کیومرث خمیس آبادی و خانم طاهره دیده بان کمال تشکر را دارند.



شکل ۱– الکتروفورز هضم آنزیمی محصول PCR به طول تقریبی ۷۵۰ bp–۶۸۰ ژن PvMSP-1 ایزوله های ایرانی پلاسمودیوم ویواکس با آنزیم محدود کننده *Pvu*-II. ستون M : سایز مارکر ۱۰۰ bp شرکت سیناکلون، نمونه های ستون ۵ و ٦ هاپلوتایپ شماره I (680 bp)،نمونه های ستونهای ۱و۳و۷و۸ هاپلوتایپ شماره II (باندهای 550 bp و ۲۰۰)و نمونه های ستونهای ۲و٤و۹ هاپلوتایپ شماره III (باندهای ٤۸۰ bp و ۲۰۰).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-13]

References

Abouie Mehrizi, A., Zakeri, S., Salmanian, A., Sanati, M. and Dinparast Djadid, N., 2009. IgG subclasses pattern and high-avidity antibody to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in an unstable hypoendemic region in Iran. *Acta Tropica* 112, pp. 1–7.

CDC., 2012. Malaria report in 2011. Ministry of Health and Medical Education.

CDC., 2015. Malaria report in 2014. Ministry of Health and Medical Education.

Cui, L., Scalante, A. and Snounou, G., 2003. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *Trends Parasitol*, 19, pp. 220-226.

Edrissian, Gh.H., 2006. Malaria in Iran: past and Present Situation. *Iranian J Parasitol*, **1**(1), pp.1-14.

Fenton, B., Clark, J.T., Kan, C.M., Robinson, J.V., Walliker, D., Ridley, R., Scaife J.G. and McBride, J.S., 1991. Structural and antigenic polymorphism of the 35 to 48 Kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol*, 11, pp. 963-971.

Giraldo, M.A., Arevalo-Pinzon, G., Rojas-Caraballo, J., Mongui A., Rodriguez, R. and Patarroyo, M.A., 2009. Vaccination with recombinant *Plasmodium vivax* MSP-10 formulated in different adjuvants induces strong immunogenicity but no protection. *Vaccine*, **28**(1), pp. 7-13.

Krogstad, DJ., 1996. Malaria as a Reemerging Disease. *Epidemiologic Reviews*. 18, 1.

Nateghpour M., Ayazian Mavi S., Keshavarz H., Rezaei R., Abedi F., Edrissian GH. and Raeisi A., 2010. Molecular monitoring of *Plasmodium vivax* infection after radical treatment in southeastern Iran. *Iranian J Arthropod-Born Dis*, **4**(1), pp. 24-30.

Parasite Biology, Malaria Parasite Bank., 2007. National Institute of Malaria Research. Avalable from: http:// www. mrcindia.org/MRC_profile/profile2/Malaria%20Parasite%20Bank.pdf

Santos-Ciminera, P.D., Alecrim, M.G., Roberts, D.R. and Quinnan, G.V.Jr., 2007. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in the state of Amazonas, Brazil/*Acta tropical*. 102, pp. 38-46.

Raza, A., Ghanchi, N., Thaver, A., Jafri, S. and Beg, M., 2013. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* clinical isolates from southern Pakistan using pvcsp and pvmsp1 genetic markers. *Malar J*. 12, 16. doi: 10.1186/1475-2875-12-16.

Trager, W. and Jensen, J.B. 1997. Continuous culture of *Plasmodium falciparum*: its impact on malaria research. *Int. J. Parasitol*. 27, pp. 989-1006.

WHO., 2014. http:// www. who.int/ malaria/ publications/world_malaria_report_2014/report/en/

WHO., 1981. Malaria parasite strain characterization, cryopreservation, and banking of isolates: a WHO Memorandum PMCID: PMC2396097; **59**(4), pp. 537–548.

Zakeri S., Barjesteh H. and Djadid N., 2006a. Merozoite surface protein-3α is a reliable marker for population genetic analysis of *Plasmodium vivax*. *Malaria Journal* 5, 53 doi:10.1186/1475-2875-5-53

Zakeri, S., Abouie Mehrizi, A., Mamaghani, Sh., Noorizadeh, A., Georges Snounou S. and Dinparast Djadid N., 2006b. Population structure analysis of *Plasmodium vivax* in areas of Iran with different malaria endemicity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **74**(3), pp. 394–400.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-13]

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-13]

Creating a reserve bank of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* isolates collected from malaria patients for use in studies on the genetic and biological features

Motevalli Haghi, A., Ph.D. **Assistant professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Nateghpour M., Ph.D. **Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran- Corresponding author: nateghpourum@tums.ac.ir**
Mohebali M., Ph.D. **Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Azarian H., **MSc. Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran. Iran**
Sharifzadeh Y., **MSc. student, Department of Medical Entomology and vector Control, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Farivar L., MSc. **Department of Medical Parasitology and Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran. Iran**
Hajjaran H., Ph.D. **Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran. Iran**
Motevalli Haghi, M., **Ph.D. student, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran**

Received: Nov 3, 2014 **Accepted: Sep 15, 2015**

ABSTRACT

Background and Aim: Considering the ongoing national malaria elimination program in Iran, establishing a bank of human *Plasmodium* genes and proteins can be very useful for research purposes. This study was conducted to collect some of the native isolates of human *Plasmodia* from endemic areas in the country.

Materials and Methods: A 2ml vein-punctured blood sample was prepared from each confirmed malaria case. The samples were dispensed in EDTA pre-dosed tubes and cryopreserved for further tests. Moreover, relevant Geimsa-stained thick and thin blood smears were kept in a safe place. Tests for genetic indicators of MSP-1 was performed for each of the *P. vivax* samples with the RFLP-PCR techniques. In addition, an in vivo drug sensitivity test was performed for each *P. falciparum* case. Collecting and cryopreserving samples will continue.

Results: A total of 131 samples, including 109, 19 and 3 *P. vivax*, *P. falciparum* and mixed samples, respectively, were preserved with relevant data such as species, parasitaemia and nationality of the donor. MSP-1 gene classification resulted in three different haplotypes including Hap.1, Hap.2 and Hap.3 with frequencies of 20.6%, 41.2% and 38.2%, respectively. The *In vivo* drug sensitivity tests on *P. facilparum* isolates showed that all of the isolates were sensitive to the current drug of choice, namely, a combination of artesunate and fansidar.

Conclusion: This study resulted in the preservation of considerable amounts of *P. vivax* and *P. falciparum* samples for further relevant studies and research purposes.

Keywords: Preservation, Malaria parasites, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, Iran

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-13]