کاربرد روشهای بیوشیمیایی و بیواسی در تشخیص مقاومت به حشره کشهای ارگانوفسفره و کاربامات در سوسری آلمانی

مهندس *ماندان ابوالحسنی* [۱]، دکترمنصوره *شایقی* [۱] و دکترحسین لدنی [۱]

چکیده :

دراین بررسی حساسیت سوشهای مختلف سوسری آلمانی در in-vivo با استفاده از خط رگرسیون (غلظت در واحد لگاریتمی و مرگ ومیر براساس پروبیت) و در in- vitro با استفاده از بررسی وضعیت آنزیم مورد مطالعه قرار گرفت.

در روش بیواسی نمفهای سن یک سوسری آلمانی (۲ تا ۳ روزه) با کاغذهای آغشته به حشره کشهای دیازینون و پروپوکسور ۲٪ آزمایش گردیدند که نتایج بدست آمده ازآزمایشها با دیازینون ۲٪ نشان داد که کلیه سوشهای آزمایش شده در مقایسه با سوش حساس متحمل بوده، باستثنای یک سوش که حساسیت بیشتری داشت به طوری که نسبت مقاومت ۰/۹۷ تا ۱/۶۷ تعیین گردید. نتایج آزمایش با پروپوکسور ۲٪ نشان داد که کلیه سوشها به این حشره کش حساس بوده به استثنای یک سوش که نسبت مقاومت ۱/۶ در مقایسه با سوش حساس مشخص گردید.

در آزمایشهای آنزیمی حساسیت سوشها با استفاده از دو روش اندازه گیری فعالیت استراز عمومی و استیل کولین استراز مورد بررسی قرار گرفت.

مقایسه نتایج آزمایشهای انجام شده در in-vitro و in–vivo بر روی نمفهای سن ۱ سوسری آلمانی مؤید این مطلب است که این دو روش برای اندازه گیری مقاومت / تحمل از حساسیت قابل قبولی برخوردار است و در آزمایش بیواسی می توان سطح حساسیت حشره را به حشره کشها مشخص نمود، درحالی که در روش in-vitro با استفاده از بررسی فعالیت آنزیم فقط می توان تغییرات کمی یا کیفی آنزیمهایی را که با حشره کشهای ارگانوفسفره و کاربامات درارتباط هستند تعیین نمود.

لازم به ذکراست که این تحقیق برای اولین بار در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

واژگان کلیدی : *سوسری ، بیواسی ، بیوشیمیایی ، مقاومت*

[۱] گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶- ۱۴۱۵۵ ، تهران ، ایران.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-07-28]

مقدمه :

سوسری آلمانی Blattella germanica یک آفت شهری با پراکندگی وسیع می باشد که به دلایل اندازه کوچک ، عادات تغذیه ای و رفتار خاص می تواند علاوه بر انتقال عوامل بیماری زا مولد حساسیت های تنفسی و تشدید بیماریهای آلرژیک باشد. مبارزه با سوسریها در اکثر نقاط به وسیله سموم مختلف انجام می گیرد (Alali F.Q., et al. 1998; Bennett G.W. et al. 1968) ولی متاسفانه به دلیل نداشتن آگاهی کافی از کاربرد عملی و استفاده بی رویه از حشره کشها نسبت به اکثر حشره کشهای ارگانوکلره، کاربامات‌ها ، ارگانوفسفره و گروه پیروترونیدها مقاومت دیده شده است (Cochran D.G. 1987; Finney D.J. 1971).

به منظور آگاهی از سطح حساسیت سوسریها جهت کاربرد علمی آنها می توان از روشهای بیوشیمیایی و بیواسی استفاده نمود (Heming Way J. et al. 1993). هدف از انجام روشهای بیوشیمیایی تعیین میزان فعالیت آنزیم در بدن حشره (سوسری آلمانی) می باشد. سعی شده است فعالیت آنزیمهای استراز عمومی و استیل کولین استراز در سوسریهای جمع آوری شده مقایسه و بررسی گردد. بدین ترتیب می توان میزان تماس حشره مورد نظر با سموم ارگانوفسفره یا کاربامات را مشخص نمود و با استفاده از روش بیواسی میزان سطح حساسیت حشره را تعیین نمود که این تستها کاملاً اختصاصی بوده و مکمل روشهای بیوشیمیایی است.

روش کار :

برای انجام این مطالعه نمونه هایی از سوسریهای دو خوابگاه دانشجویی (دانشگاه علوم پزشکی تهران – دانشگاه تربیت مدرس) و همچنین بیمارستانهای سینا – مرکز طبی کودکان جمع آوری گردید. (به دلیل وفور سوسریها دراین اماکن و نیز تماس آنها با حشره کشهای مختلف ، این مکانها جهت بررسی مقاومت مناسب تشخیص داده شدند). سوسریهای جمع آوری شده با سوش حساسی که در آزمایشگاه انستکتاریم ، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری می شود مقایسه شدند. جمع آوری سوسریها با دست و یا تله های زنده گیر انجام گرفت. نمونه های جمع آوری شده درون ظروف مخصوص پرورش که حاوی مواد غذایی خشک (نان – سویا و ....) و نیز آب بود نگهداری شدند. دراین بررسی آزمایشهای بیوشیمیایی و بیواسی بر روی نمف سن ۱ (۲ تا ۳ روزه) سوسریها انجام گرفت. در آزمایشات بیوشیمیایی میزان فعالیت استراز عمومی و نیز استیل کولین استراز مطالعه گردید. درتست استراز برای هر سوش ۱۵ تا ۲۵ نمف درنظر گرفته شد.درون لوله های مورد بررسی ۲/۵ cc از محلول سوبسترا (∝ نفتیل استات) ریخته شد، سپس یک نمونه از نمف سوسری سن ۱ را در ۱ cc آب مقطر در پلیتهای مخصوص هموژنیزاسیون بر روی ظرف یخ قرار داده و هموژنیزه نموده و ۲۵ میکرولیتر از محلول حاصل در لوله اول و ۲۵ میکرولیتر نیز به لوله دوم می افزودیم، سپس ۰/۵ cc آب مقطر به هر کدام از آنها اضافه نموده و بعد از ۳۰ دقیقه برای توقف واکنش ۰/۵ cc محلول نمک به لوله ها اضافه شد (۵ cc سدیم لوریل سولفات + ۲ cc Fast Blue B Salt) که ابتدا رنگ متمایل به صورتی و بعد از ۲ تا ۵ دقیقه تبدیل به رنگ آبی ارغوانی می شود. نتایج با استفاده از اسپکتروفتومتر و طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید(Hemingway J.S. and Georghiou G.P. 1984)

در تست استیل کولین استراز ، در ابتدا در تمام لوله ها ۱۴۵ میکرولیتر محلول تریتون ۱۰۰ – X در فسفات بافر (۰/۱ M و PH = ۷/۸) ریختیم و پس از آن ۱۰ میکرولیتر DTNB (dithiobis- Nitrobenzoic acid)و سپس ۲۵ میکرولیتر ASCHI (Acetyl Cholin Iodide) را افزودیم، ضمناً در مورد هر نمونه ۱ سری لوله آزمایش دیگر هم قرار دارد که تمام مواد ذکر شده را به آن اضافه نموده و فقط به جای ASCHI، محلول ASCHI +Propoxour افزودیم که این عمل باعث مهار فعالیت استیل کولین استراز می شود. پس از انجام این مراحل هر نمف سوسری را در ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر در پلیتهای مخصوص و بر روی ظرف یخ هموژنیزه نموده، ۲۰ میکرولیتر از محلول هموژنیزه شده داخل لوله های آزمایش قرار گرفت و بعد از گذشت ۱ ساعت از

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-07-28]

زمان تماس برای خواندن نتایج آنها را به لوله های اسپکتروفتومتری انتقال داده و برای اینکه حجم این محلول نهایی که ۰/۲ cc است به حجم لوله های اسپکتروفتومتری یعنی ۳ cc برسد به تمام لوله های آزمایش مقدار ۲ cc از فسفات بافر(سدیم) (M ۰/۱ و PH = ۷) اضافه گردید که همان بافری است که به لوله شاهد اضافه شد و نتایج در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید (Hemingway J. et al. 1993).

برای انجام آزمایش بیواسی از حشره کشهای پروپوکسور و دیازینون استفاده گردید که ابتدا کاغذهایی با غلظت ۲٪ برای این حشره کشها به عنوان غلظتی که قادر به کشتن ۹۵ تا ۱۰۰٪ از پوره های سن ۱ سوش حساس می باشد تهیه گردید (Hemingway J. et al. 1993). و با استفاده از روش تستهای حساسیت آزمایشها در ٤ تا ٥ زمان تماس با ٤ تا ٦ تکرار انجام گردید (Waldeigh R.w. et al. 1989).

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از تست بیواسی از روش آماری آنالیز پروبیت (Probit) و تحت یک برنامه آماری به نام SPSS استفاده شد (world Health Organization 1981) ، که در این روش LT90 و LT50 ، شیب خط ، خطای معیار (SE) و مجذور X^2 برای کلیه سوش محاسبه گردید.

آنالیز واریانس اطلاعات مربوط به تستهای استراز و استیل کولین استراز با استفاده از یک دستگاه رایانه در برنامه آماری SPSS با آزمون توکی (Tukey) و حدود اطمینان ٪۵= α انجام شد.

بحث و نتیجه گیری :

نتایج تستهای انجام شده بر روی سوسریهای جمع آوری گردیده از خوابگاههای دانشجویی تربیت مدرس و دانشگاه علوم پزشکی تهران و بیمارستانهای سینا و مرکز طبی کودکان با استفاده از روشهای بیواسی و بیوشیمیایی بشرح زیر می باشد:

الف) دیازینون و استیل کولین استراز – استراز

مقایسه میان سوش مرکز طبی کودکان با خوابگاه ۹ ، خوابگاه تربیت مدرس و بیمارستان سینا در روش بیواسی و بیوشیمیایی اختلاف معنی دار نشان می دهد (جدول ۱) که این اختلاف با توجه به حساس بودن مرکز طبی کودکان نسبت به سوشهای ذکر شده در تماس با دیازینون قابل تفسیر است.

سوش بیمارستان سینا و خوابگاه ۹ از نظر تست بیواسی اختلاف معنی دار نداشته و هر دو به دیازینون ۲٪ متحمل می باشند. در تست استراز هم اختلاف معنی دار مشاهده نگردید ولی در سنجش (استیل کولین استراز) بین آنها اختلاف معنی دار است. باتوجه به جدول (۲) می توان مشاهده نمود که عدد به دست آمده از میانگین عبور نور در سوش بیمارستان سینا از خوابگاه ۹ بیشتر است. سوش بیمارستان سینا و خوابگاه تربیت مدرس اختلاف معنی دار نشان نداد و از نظر مقایسه فعالیت آنزیمی با هم مطابقت دارند. حال آن که عدد بدست آمده از میانگین عبور نور در بیمارستان سینا بیشتر است.

مقایسه میان خوابگاه ۹ و خوابگاه تربیت مدرس دارای اختلاف معنی دار نمی باشد. بنابراین هر دو نسبت به دیازینون ۲٪ متحمل بوده و از نظر مقایسه فعالیت آنزیمی خوابگاه ۹ دارای فعالیت کمتر است جدول (۱).

ب) پروپوکسور – استیل کولین استراز – استراز

نتایج دو روش تست بیواسی و بیوشیمیایی درسوشهای مورد تست با پروپوکسور ۲٪ در جدول (۳) . بیانگر این مطلب است که تستهای بیواسی در مرکز طبی کودکان با دو سوش خوابگاه ۹ و تربیت مدرس اختلاف معنی دار نشان نمی دهد و نسبت به پروپوکسور ۲٪ حساس هستند. در آزمایشهای بیوشیمیایی استراز و استیل کولین استراز بین مرکز طبی کودکان با ۲ سوش خوابگاه ۹ و تربیت مدرس وجود اختلاف معنی دار به دلیل فعالیت پایین آنزیم در سوش مرکز طبی کودکان (باتوجه به عدد بدست آمده از میانگین عبور نور) در مقایسه با دو سوش ذکر شده می باشد جداول (۲و ٤).

سوش مرکز طبی کودکان با بیمارستان سینا دارای اختلاف معنی دار است زیرا بیمارستان سینا در مقایسه با مرکز طبی کودکان نسبت به پروپوکسور ۲٪ متحمل و نیز از نظر میانگین عبور نور دارای عدد پایین تری است که نشانه بالا بودن میزان جذب و فعالیت بالای آنزیم در این سوش در

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-07-28]

مقایسه با مرکز طبی کودکان می باشد. باتوجه به جدول (٤) سوش بیمارستان سینا و خوابگاه ۹ در تست بیواسی دارای اختلاف معنی دار هستند زیرا بیمارستان سینا به پروپوکسور متحمل و خوابگاه ۹ حساس می باشد ولی در تست استراز اختلاف معنی دار دیده نمی شود زیرا این تست یک تست عمومی است درحالی که تست ACHE اختصاصی تر است و ا ختلاف بین دو سوش در تست ACHE معنی دار است. بیمارستان سینا با خوابگاه تربیت مدرس در تست بیواسی دارای اختلاف معنی دار می باشند ولی در تستهای بیوشیمیایی اختلاف معنی دار نیست. خوابگاه ۹ و تربیت مدرس هم از نظر تستهای بیواسی و بیوشیمیایی اختلاف معنی دار نشان نمی دهند.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-07-28]

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-07-28]

جدول ۱- مقایسه دو روش بیوشیمیایی و بیوپسی سوشهای مختلف سوسری آلمانی نسبت به یکدیگر در تماس با دیازینون ۲٪

سوش	مرکز طبی کودکان			انسکتاریوم			بیمارستان سینا			خوابگاه تربیت مدرس			خوابگاه ۹		
روش	AchE	استراز	بیواسی	AchE	استراز	بیواسی	AchE	استراز	بیواسی	AchE	استراز	بیواسی	AchE	استراز	بیواسی
خوابگاه ۹	S	S	S	S	S	S	S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S			
خوابگاه تربیت مدرس	S	S	S	S	S	S	N.S	N.S	N.S						
بیمارستان سینا	S	S	S	S	S	S									
انسکتاریم	N.S	S	N.S												
مرکز طبی کودکان															

AchE = استیل کولین استراز

S = اختلاف معنی دار است.

N.S = اختلاف معنی دار نیست.

جدول ۲ - نتایج آنالیز آماری تست فعالیت استراز بر روی سوسریهای جمع آوری شده از اماکن مختلف

سوش	Minimum	Maximum	Mean	SE = Standard Error	Sd = Standard deviation	Number
خوابگاه تربیت مدرس	۴۷/۵۰۰۰	۶۲/۷۵۰۰	۵۳/۶۳۸۹	۱/۵۰۱۸	۴/۵۰۵۴	۹
خوابگاه ۹	۴۷/۵۰۰۰	۶۰/۷۵۰۰	۵۴/۳۸۴۶	۱/۱۴۵۵	۴/۱۳۰۲	۱۳
بیمارستان سینا	۴۸/۰۰۰	۶۲/۲۵۰۰	۵۵/۴۱۶۷	۱/۱۰۸۶	۵/۰۸۰۲	۲۱
انسکتاریم	۶۲/۰۰۰	۸۱/۷۵۰۰	۷۳/۸۴۷۸	۱/۱۰۳۳	۵/۲۹۱۴	۲۳
مرکزطبی کودکان	۵۵/۵۰۰۰	۶۴/۷۵۰۰	۶۰/۱۵۷۹	۰/۶۵۶۵	۲/۸۶۱۶	۱۹

انحراف معیار = SE

میانگین عبور = Mean

جدول ۳- مقایسه دو روش بیوشیمیایی و بیواپسی سوشهای مختلف سوسری آلمانی نسبت به یکدیگر در تماس با پروپوکسور ۲٪

مرکز طبی کودکان			انسکتاریوم			بیمارستان سینا			خوابگاه تربیت مدرس			خوابگاه ۹		سوش
AchE	استراز	بیواسی	AchE	استراز	بیواسی	AchE	استراز	بیواسی	AchE	استراز	بیواسی	AchE	استراز	بیواسی	روش
S	S	N.S	S	S	S	S	N.S	S	N.S	N.S	N.S				خوابگاه ۹
S	S	N.S	S	S	S	N.S	N.S	S							خوابگاه تربیت مدرس
S	S	S	S	S	S										بیمارستان سینا
N.S	S	N.S													انسکتاریم
															مرکز طبی کودکان

AchE = استیل کولین استراز

S = اختلاف معنی دار است.

N.S = اختلاف معنی دار نیست.

جدول ۲ - نتایج آنالیز آماری تست فعالیت استراز بر روی سوسریهای جمع آوری شده از اماکن مختلف

سوش	Minimum	Maximum	Mean	SE = Standard Error	Sd.= Standard deviation	Number
خوابگاه تربیت مدرس	۲۰	۵۱/۷۵۰۰	۶۳/۵۰۰۰	۵۶/۹۹۲۵	۰/۸۳۱۳	۳/۷۱۷۶
خوابگاه ۹	۲۰	۳۰/۵۰۰۰	۵۹/۷۵۰۰	۵۰/۷۱۲۵	۱/۵۰۳۱	۶/۷۲۲۱
بیمارستان سینا	۱۵	۴۱/۵۰۰۰	۶۹/۲۵۰۰	۵۴/۰۸۳۳	۲/۱۳۷۲	۸/۲۷۷۴
انسکتاریم	۱۹	۷۰/۰۰۰	۹۴/۰۰۰	۸۳/۱۷۱۱	۱/۴۴۵۹	۶/۳۰۲۶
مرکزطبی کودکان	۲۴	۷۲/۰۰۰	۸۹/۰۰۰	۷۸/۷۳۹۶	۰/۹۰۴۷	۴/۴۳۲۱

انحراف معیار = SE

میانگین عبور = Mean

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-07-28]

منابع :

Alali F.Q., Kaakeh W. and Bennett G.W. (1998) Annonaceous are acetogenins as natural potent toxicity against insecticide susceptible and resistance German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.***91**(3): 641- 649.

Bennett G.W. SW. T Spinks (1968) insecticide resistance of German Cockroaches from various areas of Luisiana. *J. Econ. Ent.* **61:** 426- 431.

Cochran D.G. (1987) A selection for Pyrethroid resistance in the German cockroach (dictypotera: Blatellidae). *J. Econ. Ent.* **80:** 1117-1121.

Finney, DJ. 1971: Probit analysis . 3 rd edition. Cambridge University press. Cambridge.

Heming Way. J. Small G.J. and Monro. A.G. (1993) Possible mechanisms of organophosphorus and carbamate insecticide Resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattelidae) from different Geographical areas. *J. Econ. Entomol.* **86**(6): 1623- 1630.

Hemingway J.S., Geor ghiou G.P. (1984) Baseline Esterase levels for Anopheline and culicine mosquitoes mosquu. *News* **44**(1): 33-35.

Waldeigh R.W., Koehler P.G., Patterson R.S. (1989) Comparative susceptibility in North American Blatella (orthoptera: Blatellidae) species to insecticides. *J. Econ. Ent.* **82:** 1130- 1133.

World Health Organization (1981) Instruction for determining the susceptibility or resistance of adult mosquito to organochlorine.

Organaophosphorine and carbamate insecticides–diagnostic test unpublished document, WHO/VBC/81: 806.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-07-28]

COMPARISON OF BIOCHEMICAL AND BIOASSAY METHODS IN ASSESSING ORGANOPHOSPHATE RESISTANCE IN BLATTELLA GERMANICA

Abolhasani[1] M., MSPH ; Shaeghi M.,[1] Ph.D; Ladonii H.,[1] Ph.D

In this study we employed two methods for gauging the sensitivity of *B. germanica* strains to organophosphorus insecticides: an in-vivo bioassay that used linear regression analysis (with mortality on a probit scale and logarithm of concentration) and an in-vitro enzyme assay.

In the bioassay method, *B. germanica* nymphs of stage 1 (2-3 days old) were exposed to patches of paper impregnated with 2% diazinon and propoxur. Compared to the sensitive (reference) strains, all but one of the tested strains showed resistance to diazinonzinon with resistance ratios of 0.97 to 1.67. As for propoxur, all strains were sensitive with the exception of one subject that showed a resistance ratio of 1.6.

The enzyme assays used common esterase and acetylcholine esterase methods.

Comparison of in-vivo and in-vitro tests on stage 1 nymphs of *B. germanica* shows that both methods are reasonably sensitive in measuring resistance/sensitivity ratios. In addition, the bioassay modality makes it possible to gauge the degree of insecticide sensitivity while the in-vitro method can only determine quantitative or qualitative changes in enzymes effected by carbamates and organophosphates.

This study is the first of its kind, conducted by the school of Public Health in Tehran University of Medical Sciences.

Keywords: *Cockroach, Bioassay, Enzyme Assay, Resistance*

[1]Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health and Institute of Public Health Research Terhan, University of Medical Sciences. P.O.Box. 6446- 14155 , Tehran, Iran.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-07-28]