بررسی میزان آلودگی گونه های آنوفل استفنسی و آنوفل کولیسفاسیس به اسپروزوئیت مالاریا درکانونهای آندمیک ایران به روش PCR

دکتر مهدی آسمار[*1], آرپی ترهوانسیان[1], دکتر سعیدرضا نداف[1], دکتر نورایر پیازک[1] و دکتر حسین معصومی[2]

چکیــده:

در این پژوهش جمعا" تعداد ۵۲۶ عدد پشه آنوفل که شامل ۵۰۹ نمونه (۹۶/۷۶٪) آنوفل استفنسی و ۱۷ نمونه (۳/۲۴ ٪) آنوفل کولیسفاسیس در دو پیک فعالیت پشه ها (در ماههای خرداد – تیر و شهریور – مهر) در خلال سالهای ۸۰-۱۳۷۹ به روش جمع آوری کلی (Total catch) و در ۳۶ روستا از توابع شهرستانهای میناب, ایرانشهر و کهنوج جمع آوری و از نظر جنس و گونه مورد شناسایی قرار گرفتند. در این بررسی فراوانی آنوفل استفنسی در شهرستان میناب ۱۰۰ ٪, ایرانشهر ۹۵ ٪ و کهنوج ۹۴/۴٪, همچنین فراوانی آنوفل کولیسفاسیس در شهرستان میناب صفر درصد, ایرانشهر ۵ ٪ و کهنوج ۵/۶ ٪ تعیین گردید. سر و سینه پشه های جمع آوری شده توسط سوزن حشره شناسی جدا گردیده و به روش فنل – کلروفرم از آنها DNA استخراج شده و به روش Polymerase chain Reaction (PCR) و Nested- PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی پلاسمودیومهای انسانی مورد بررسی قرار گرفت و در نتیجه ۳ مورد از پشه های آنوفل استفنسی میناب و یک مورد از پشه های آنوفل کولیسفاسیس ایرانشهر به پلاسمودیوم ویواکس آلوده بودند و یک مورد (۰/۱۹ ٪) از آنوفل استفنسی های فوق الذکر علاوه بر پلاسمودیوم ویواکس به پلاسمودیوم فالسیپاروم نیز آلوده بوده است. در مجموع ۰/۵۸ ٪ غدد بزاقی آنوفل استفنسی های جمع آوری شده از شهرستانهای سه گانه فوق الذکر به پلاسمودیوم ویواکس, ۰/۱۹ ٪ به پلاسمودیوم ویواکس + پلاسمودیوم فالسیپاروم و ۹/۰۹ ٪ غدد بزاقی آنوفل کولیسفاسیس های جمع آوری شده به پلاسمودیوم ویواکس آلوده بوده است.

واژگان کلیدی : *آلودگی, آنوفل استفنسی, آنوفل کولیسیفاسیس, مالاریا, آندمیک, PCR*

[*]. عهده دار مکاتبات

[1]. انستیتو پاستور ایران ، گروه انگل شناسی

[2]. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، مرکز مدیریت بیماریها

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

مقدمه:

بر اساس بررسیهای انجام شده از تعداد ۱۹ گونه آنوفلهای منتشره در ایران, تعداد ۷ گونه شامل *An. stephensi* , *An. superpictus* , *An. saccarovi* , *An. maculipennis* , *An. fluviatilis* , *An. culicifacies* , *An. d' thali* قادر به انتقال بیماری مالاریای انسانی می باشند(Manouchehri A.V. et al. 1992, Zaim M. et al. 1998).

تعیین میزان آلودگی و بررسی توانائی انتقال بیماری مالاریا در آنوفلهای مختلف تا کنون با تشریح قسمتهای مختلف بدن پشه و بررسی آلودگی معده به اسپروسیست به منظور تعیین میزان آلودگی و بررسی غدد بزاقی آنها از نظر آلودگی به اسپروزوئیت جهت تعیین قدرت انتقال مالاریا انجام می گرفته است که کاری بس دشوار و وقت گیر می باشد. مخصوصا" چنانچه این بررسی در مناطقی انجام گیرد که وفور پشه ها بویژه پشه های مسن کم باشد. با توجه به همشکلی اسپروزوئیت گونه های مختلف پلاسمودیومهای انسانی, تشخیص انواع آنها از یکدیگر به روش میکروسکپی غیر ممکن است مگر این که به سایرروشها منجمله روشهای مولکولی (PCR) توسل جست تا بتوان با سهولت و اطمینان بیشتری ضمن تعیین نوع پلاسمودیوم میزان آلودگی و آلوده کنندگی پشه ها را در انتقال بیماری مالاریا مشخص نمود.

روش کار:

جمع آوری پشه های مالاریا در این پژوهش به روش Total catch و به صورت نمونه برداری اتفاقی در دو پیک فعالیت پشه ها (پیک اول در ماههای خرداد و تیر و پیک دوم در ماههای شهریور و مهر) سال ۸۰-۱۳۷۹ در ۳۶ روستا از توابع شهرستانهای میناب, ایرانشهر و کهنوج (در هر شهرستان ۱۲ روستا در مناطق جلگه, دامنه و ارتفاع) انجام گرفته است. تشخیص گونه های پشه های آنوفل بر اساس کلید تشخیص شاهگودیان (Shahgudian E.R. 1960) بوده و پس از تعیین گونه, هر یک از پشه ها را در یک لوله اپندرف قرار داده, ضمن ثبت اطلاعات مربوط به محل جمع آوری و نصب اتیکت در دمای ۴+ درجه سانتیگراد و در اسرع وقت به بخش انگل شناسی انستیتو پاستورایران ارسال گردیده است. سپس با استفاده از سوزن تشریح سر و سینه پشه را از شکم جدا کرده و در یک لوله اپندرف مجزا قرار داده و جهت جدا سازی و تخلیص DNA پلاسمودیوم احتمالی تخصیص داده شد.

استخراج: سر و سینه هر یک از پشه های جمع آوری شده را به روش (Ballinger-Grobtree M.E. et al. 1992). در ۱۵۰ µl بافر لیز کننده از محصول شرکت (Applied biosystem) با استفاده از بورایر به صورت سوسپانسیون در آورده و به آن پروتئیناز K افزوده تا غلظت آن به 100µg/ml برسد و مجموعه را به مدت یک ساعت در انکوباسیون ۵۵ درجه سانتیگراد قرار دادیم.

سپس به آن مقدار یک حجم فنل – کلروفرم اضافه کرده و با دور ۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم. فاز رویی را جدا کرده و به آن مقدار یک حجم کلروفرم افزوده و آن را به مدت ۳ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ نمودیم.

فاز رویی را جدا کرده و به آن مقدار سه حجم الکل ۹۵٪ افزوده و به مدت ۲۴ ساعت آنرا در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد قرار دادیم و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و الکل ۹۵٪ را حذف کرده و به آن الکل ۷۰٪ افزوده و با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم در پایان الکل آنرا حذف کرده و به آن مقدار ۳۰µl بافر Tris-EDTA افزوده و DNA استخراج شده را در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمودیم

انجام: ابتدا از DNA استخراج شده هر ۱۰ آنوفل مربوط به هر یک از شهرستانهای تحت بررسی (از DNA هر آنوفل ۱µl) در یک لوله اپندرف Mass screening تهیه نموده و به روش PCR مورد آزمایش قرار دادیم و در صورت مثبت بودن DNA استخراج شده هر۱۰ آنوفل را بطور جداگانه مورد بررسی قرار دادیم.

برای انجام PCR در یک لوله بمقدار ۲۰µl از محلولهای زیر را به صورت Master mix تهیه کرده

10 × buffer	1 ×
dNTps	200 µm
$MgCl_2$	1.5 µm
Taq poly	1 U
Forward Primers	50 pm
Severse Primers	50 pm
Distilled H_2O	UP to 20 µl
DNA Template	1 µl for single fly and 10 µl for pool

به منظور انجام Nested-PCR مقدار ۱µl از آمپلی مر مرحله اول را با پرایمرهای اختصاصی هر یک از پلاسمودیومهای ویواکس و فالسیپاروم با همان مقادیر و غلظتهای مرحله اول به روش PCR مورد آزمایش قرار داده و محصول آنرا در ژل ۱/۵٪ آگاروز الکتروفورز نمودیم (Assmar M. et al. 2003).

پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش بر اساس تفاوتهای موجوددر ژن (ssr Small subunit ribosomal RNA) به ترتیب زیرطراحی گردیده است (Snounou G. et al. 1993a, Snounou G. et al. 1993b).

پرایمرهای اختصاصی جنس *plasmodium*

r PLU-5

5´-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3´

5´-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG -3´

پرایمرهای اختصاصی گونه *P. falciparum*

$r FAL_1$

5´-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATAT-3´

5´–ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3´

پرایمرهای اختصاصی گونه *P. vivax*

$rVIV_1$

5´–CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3´

5´-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3´

نتایج :

در این پژوهش جمعا" تعداد ۵۲۶ عدد پشه آنوفل شامل ۳۰۸ نمونه (۵۸/۵ ٪) از شهرستان میناب, ۸۳ نمونه (۱۵/۸٪) از ایرانشهر و ۱۳۵ نمونه (۲۵/۷ ٪) از شهرستان کهنوج جمع آوری گردیده است که ۵۰۹ نمونه آن (۹۶/۷۶ ٪) از نوع آنوفل استفنسی و ۱۷ نمونه (۳/۲۴ ٪) از نوع آنوفل کولیسفاسیس بوده اند.

فراوانی آنوفل استفنسی در شهرستانهای سه گانه تحت بررسی به ترتیب در میناب ۳۰۸ مورد (۱۰۰٪), در ایرانشهر ۸۳ مورد (۹۵ ٪) و در کهنوج ۱۳۵ مورد (۹۴/۴٪) بوده است (نمودار شماره ۱).

همچنین فراوانی آنوفل کولیسفاسیس در ایرانشهر ۴ مورد (۰/۵ ٪) و در کهنوج ۷ مورد (۵/۶ ٪) بوده است. ضمنا" در

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

شهرستان میناب آنوفل کولیسفاسیس جمع آوری نگردید (نمودار شماره ۱).

در بررسی مولکولی به روش PCR جمعا" تعداد ۴ نمونه از سر و سینه پشه های تحت بررسی به انگل مالاریا آلوده بوده که ۳ مورد فقط به پلاسمودیوم ویواکس (*P. vivax*) و یک مورد از نوع آلودگی مضاعف (mixed infection) پلاسمودیوم ویواکس (*P. vivax*) و پلاسمودیوم فالسیپاروم (*P. falciparum*) بوده است (تصویر شماره ۱).

به عبارت دیگر سه مورد از پشه های آنوفل استفنسی متعلق به شهرستان میناب و یک مورد از پشه های آنوفل کولیسفاسیس مربوط به شهرستان ایرانشهر به پلاسمودیوم ویواکس (*P. vivax*) و یک مورد از پشه های آنوفل استفنسی فوق الذکر متعلق به شهرستان میناب علاوه بر آلودگی به پلاسمودیوم ویواکس (*P. vivax*) به پلاسمودیوم فالسیپاروم (*P. falciparum*) نیز آلوده بوده است ضمناً پشه های جمع آوری شده از شهرستان کهنوج از نظر آلودگی به انگل مالاریا در تست PCRمنفی بوده اند.

در مجموع ۰/۷۵٪ غدد بزاقی آنوفلهای جمع آوری شده از شهرستانهای میناب, ایرانشهر و کهنوج به پلاسمودیومهای انسانی آلوده بوده که از این تعداد یک مورد (۰/۱۹٪) از آنوفل استفنسی های جمع آوری شده علاوه بر پلاسمودیوم ویواکس *P. vivax* به پلاسمودیوم فالسیپاروم *P. falciparum*, ۳ مورد (۰/۵۸٪) به *P. vivax*, ۱مورد (۹/۰۹ ٪) از آنوفل کولیسفالیس های جمع آوری شده به پلاسمودیوم ویواکس آلوده بوده اند (نمودار شماره ۲).

بحث :

برای تعیین آلودگی و آلوده کنندگی پشه های آنوفل به روش تشریح لازم است تعداد زیادی از پشه ها را تک تک تشریح نمود که کار فوق العاده پرزحمت و وقت گیری می باشد و هرگز نمی توان پشه ها را در دستجات بیشتری به صورت گروهی تعیین آلودگی نمود, در صورتی که انجام این کار به روش PCR به راحتی امکان پذیر است.

با تشریح پشه آنوفل قادر به تشخیص جنس و گونه انگل مالاریا نخواهیم بود فقط می توان آلودگی پشه را به انگل مالاریا تعیین نمود, در صورتی که با روش Nested-PCR می توان ضمن تعیین آلودگی پشه آنوفل به انگل مالاریا, جنس و گونه انگل مالاریا را نیز مشخص نمود.

برای تعیین آلودگی ناقلین مالاریا به انگل به روش تشریح حتما" لازم است از پشه های تازه جمع آوری شده استفاده گردد در صورتی که در روش PCR نیازی به تازه بودن پشه نخواهد بود و میتوان از نمونه های کهنه و خشک شده نیز استفاده کرد.

در سالهای اخیر به دلیل خشکسالی در کشور به ویژه در مناطق جنوبی ایران جمعیت پشه های آنوفلینی رو به کاهش گذارده و در این تجربه تعداد نمونه های کمی از پشه ها جمع آوری گردید و این امر موجب شد تا نتوانیم میزان آلودگی و پتانسیل آلوده کنندگی پشه ها را به نحو مطلوبی تعیین نمائیم.

لذا لازم است این گونه تحقیقات در وسعت بیشتری و در سایر گونه های آنوفلینی انجام شود تا بتوان با دقت و اطمینان بیشتری در این مورد اظهار نظر نمود.

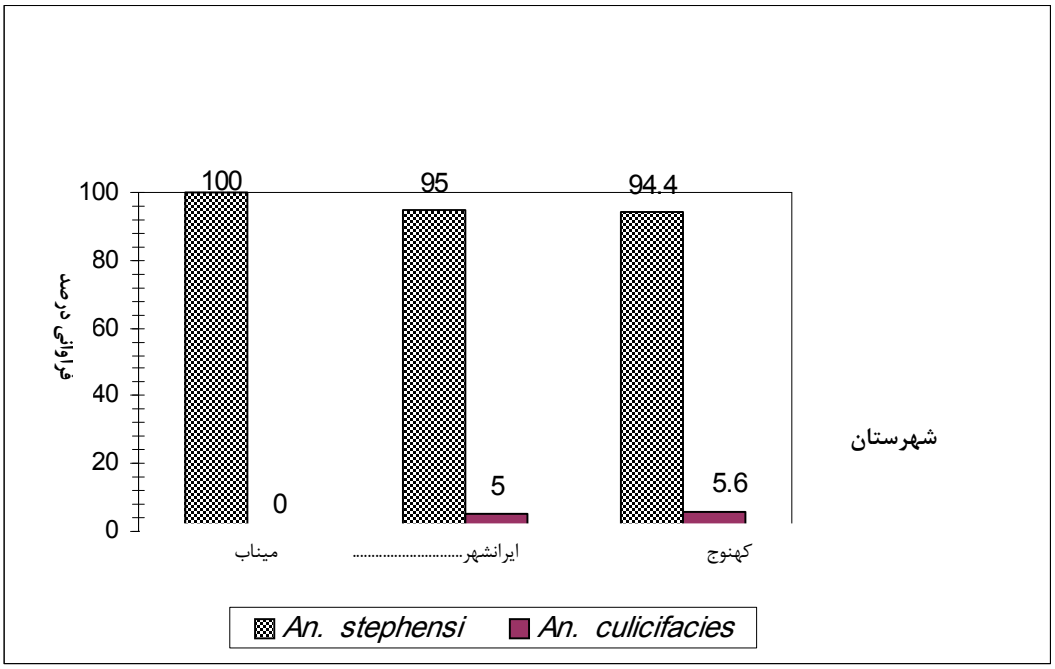
[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

تشکر و قدردانی:

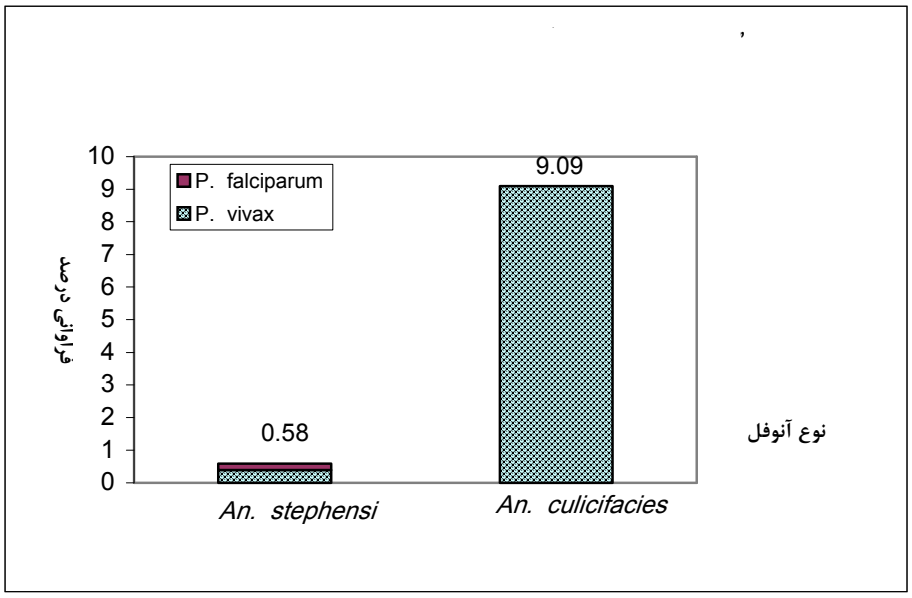
این پژوهش با صرف هزینه های لازمه از محل اعتبارات انستیتو پاستور ایران انجام گرفته است لذا جا دارد از مساعدتهای بی دریغ جناب آقای دکتر محمد تقی خانی ریاست محترم انستیتو پاستور ایران و آقایان : دکتر علی حائری معاونت محترم پژوهشی و دکتر شمس الدین نیکنامی معاونت محترم پشتیبانی انستیتو پاستور ایران کمال تشکر را داشته باشد.

همچنین از زحمات ارزنده ای که جناب آقای دکتر عارف امیرخانی ریاست محترم بخش اپیدمیولوژی انستیتو پاستور ایران بخاطر همکاریهای بیدریغشان در طراحی گرافها و سرکار خانم زهره خیرخواهان به خاطر زحماتی که در تایپ این مقاله متحمل شده اند صمیمانه تشکر می نماید.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

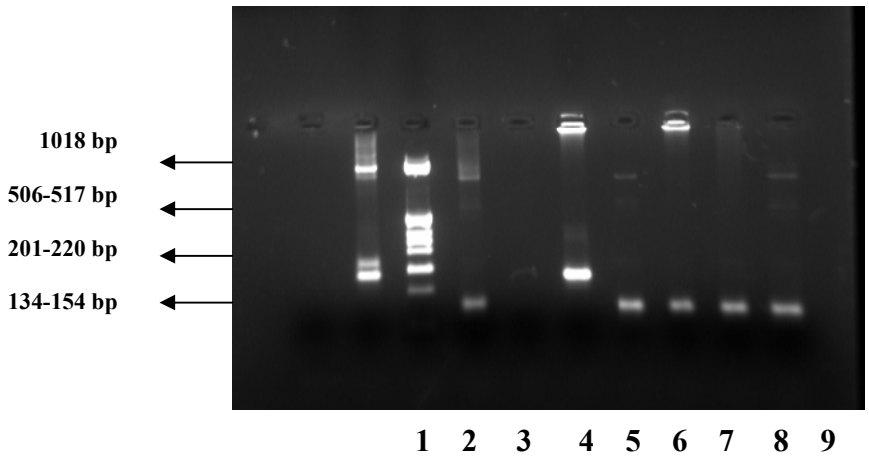


نمودار ۱ – فراوانی پشه های آنوفل بر حسب گونه و شهرستانهای تحت بررسی



نمودار ۲ – فراوانی آلودگی پشه های آنوفل به انگل مالاریا برحسب نوع پلاسمودیوم

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]



تصویر ۱ : بررسی از نظر آلودگی به اسپیروزوئیت انگل مالاریا در پشه های آنوفل استفنسی و آنوفل کولیسفاسیس باندهای 205 bp و 120 bp بترتیب نشانگر آلودگی پشه به *P. falciparum* و *P. vivax* می باشد.
ردیف۱ , کنترل *P. falciparum*؛ ردیف ۲, مارکر 1 kbp ladder؛ ردیف ۳, کنترل *P. vivax*؛ ردیف ٤, کنترل منفی؛ ردیف ٥ , *P. falciparum* ؛ ردیف ٦-٩, *P. vivax*

منابع :

Assmar M., Ter hovanessian A., Jahani M. R., Nahrevanian H., Amirkhani A., Piazak N., Esmaeili A.R., Farahmand M. and Zare M. (2003) Molecular Epidemiology of Malaria in Endemic Areas of Iran. *South East Asian*. *Journal of Tropical*. *Medicine*. **34**: 15-19.

Ballinger-Crabtree M. E., Black W. C. and Miller B. R. (1992) Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *AEDES AEGYPTI* subspecies and populations. *American Journal of tropical medicine and Hygine*. **47**(6): 893-901.

Manouchehri A. V., Zaim M. and Emadi A. (1992) M. Areview of malaria in Iran, 1975-1990. *Journal of American mosquito control*. **8**: 381-385.

Shahgudian E.R. (1960) A kevto the Anophelines of Iran. *Acta Medica Iranian*. **3**: 38-48.

Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaithong S. and neilbrown K. (1993 a) Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Jornal several of Molecular and Biochemical Parasitology*. **58**: 283-292.

Snounou G., Viriyakosol S., Ping Zhu X., Jarra W., Pinheiro L., Rosario E., Thaithong S. and Neil Brown K. (1993 b) High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Jornal several of Molecular and Biochemical Parasitology*. **61**: 315-320.

Zaim M., Ghavami M. B., Nazari M., Edrissian G.H. and Nateghpour M. (1998) Cyfluthrin (EW. 050)- im pregnated Bednets in a malaria control program in Ghassreghand (Baluchistan, Iran). *Journal of the American mosquito control Association*. **14**(4): 421-430.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

PCR DETECTION OF MALARIA PARASITES IN ANOPHELES STEPHENSI AND ANOPHELES CULICIFACIES MOSQUITOES COLLECTED FROM SOUTHERN ENDEMIC FOCI OF IRAN

Assmar M.[*3], Ph.D; Ter Hovanessian A.[1], MSc; Naddaf S.R.[1], Ph.D; Piazak N.[1], Ph.D; Masomi H.[4], Ph.D

A total of 509 Anopheles Stephensi and 20 Anopheles Culicifacies mosquitoes were collected during two seasonal activity peaks (June, July, August and September) in the years 2000 and 2001, from 36 localities around Minab, Iranshahr and Kahnouj cities. The identity of specimens was confirmed using Shahgodian PAN morphological key. DNA was extracted from the head and thorax of all specimens and subjected to nested PCR using species-specific primers for Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum .Three *An. Stephensi mosquitoes* from Minab and one *An . Culicifacies* mosquito from Iranshahr were positive for *P. vivax,* while one *An. Stephensi* was shown to harbor both *P .vivax* and *P. falciparum.*

Key Words: *Infection , Anopheles Stephensi , Anopheles Culicifacies , Malaria , Endemic,*
PCR

*. Author to whom all correspondence should be addressed.
3. Parasitology Dept. Pasteur Institute of Iran
4. Center for communicable disease control, Ministry of Health and Medical Eeducation, Tehran, Iran

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]