Archive of SID

تشخیص گونه‌های انگل مالاریا به روش Nested-PCR در پشه‌های ناقل و خون‌های آلوده منطقه چابهار و ایرانشهر ایران

دکتر محمدعلی عشاقی[۱]، محمدتقی مرادی[۲]، بهروز تقی‌لو[۲]

Title: *Specific detection of malaria parasites using nested-PCR in individual mosquitoes and infected bloods in Chabahar and Iranshahr, Iran.*

Authors: *Oshaghi MA,(PhD); Moradi MT,(MSc); Taghilo B,(MSc).*

Introduction: *The aim of this study was to identify infectivity of Anopheles species with malaria parasites. Infectivity of malaria vector mosquitoes and infected bloods were tested by nested polymerase chain reaction (nested-PCR) assay in Chabahar and Iranshahr districts of Sistan-Baluchestan province, southeast of Iran.*

Mehtods: *Investigation was carried out on 14 infected blood samples and 1294 female anopheline mosquitoes (head+thoarax) which were collected during 2 malaria transmission peaks, April-May and September-October 2002. The genus- and species-specific primers corresponding to small subunit ribosomal DNA (ssrDNA) of malaria parasites were used for specific amplification by a nested amplification and then the amplified DNA products were detected in stained gels.*

Results: *The results revealed that Plasmodium vivax is the common malaria parasite species in the region, however, a proportion of blood samples were mixed infected by both P. falciparum and P.vivax. Among different anopheline species tested, only mosquitoes of Anopheles stephensi, with 0.22% infectivity, were infected by P.vivax.*

Conclusion: *The Nested-PCR assay for detection and identification of malaria parasites in mosquitoes is used for the first time in Iran and has proven to be more sensitive, accurate, and friendly than other diagnostic methods and recommended for epidemiological studies in different malarious regions of Iran.*

Keywords: *Malaria, Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Nested-PCR, Anopheles stephensi, Iran.*

۱- گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقاتی بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- گروه حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده:

مقدمه: *هدف از انجام مطالعه تعیین میزان آلودگی آنوفل‌ها به اسپروزوئیت انگل مالاریا بوده است. به این منظور آلودگی پشه‌های ناقل وخون‌های انسانی آلوده به انگل مالاریا منطقه چابهار وایرانشهر استان سیستان و بلوچستان ایران به روش ملکولی* Nested-PCR *مورد بررسی قرار گرفت.*

روش کار: *در این مطالعه سر و سینه ۱۲۹٤ آنوفل ماده و ١٤ نمونه خون آلوده به انگل از دو پیک انتقال بیماری مالاریا در ماه‌های اردیبهشت- خرداد ومهر- آبان سال ۱۳۸۱ جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی گونه‌های انگل به روش* Nested-PCR *با پرایمرهای اختصاص به جنس وگونه طراحی شده از بخش* ssrDNA *ژن ریبوزومال* DNA *و الکترفورز محصولات* PCR *در ژل آگارز حاوی اتیدیوم بروماید انجام شد.*

نتایج: *نتایج این مطالعه نشان داد که گونه غالب انگل مالاریا گونه پلاسمودیوم ویواکس می‌باشد. با این حال بخشی از نمونه‌های خون آلوده، دارای آلودگی توأم به پلاسمودیوم فالسیپاروم و ویواکس بودند. در بین آنوفل‌های آزمایش شده فقط گونه آنوفل استفنسی با ۲۲٪، به گونه پلاسمودیوم ویواکس آلودگی نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *تشخیص آلودگی آنوفل‌ها به انگل مالاریا تا حد گونه بوسیله روش* Nested-PCR *برای اولین بار در ایران انجام می‌شود و نشان داد که این روش بسیار حساس، دقیق و کاربردی تر از سایر روش‌های تشخیصی می‌باشد و توصیه می‌شود در مطالعات اپیدمیولوژیک مالاریا در مناطق مختلف مالاریاخیز کشور به کار گرفته شود.*

گل‌واژگان: *مالاریا، پلاسمودیوم ویواکس، پلاسمودیوم فالسیپاروم،* Nested-PCR*، آنوفل استفنسی، ایران*

مقدمه:

مالاریا یک بیماری عفونی است که توسط تک‌یاخته انگلی از جنس پلاسمودیوم ایجاد و به وسیله گونه‌های بخصوصی از پشه‌های آنوفل ماده منتقل می‌شود. این بیماری از دیرباز به عنوان مهمترین بیماری عفونی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به شمار می‌رود و علی‌رغم سالها مبارزه هنوز هم یکی از مشکلات مهم بهداشتی ایران بخصوص در مناطق جنوب شرقی می‌باشد. این منطقه با داشتن حدود ۵٪ جمعیت کل کشور شامل استانهای سیستان و بلوچستان، هرمزگان و قسمت گرمسیری استان کرمان دارای بیشترین موارد بیماری می‌باشد بطوریکه در سال ۱۳۸۰ تعداد ۱۱۶۹۲ مورد مالاریا از این منطقه گزارش شد که ۶۱٪ کل موارد مالاریای کشور را شامل می‌شد. در این میان شهرستان چابهار با تعداد ۱۹۶۴ مورد بیماری و میزان بروز انگلی ۱۱/۹۲ در هزار نفر دارای بیشترین میزان بروز در سطح کشور بوده است. شهرستان ایرانشهر نیز با تعداد ۲۵۴۸ مورد بیماری کشف شده و بروز انگلی ۸/۱۸ در هزار نفر مقام دوم را در سطح کشور دارا می‌باشد. بیماری در این مناطق هر ساله دارای دو پیک فروردین- تیر و شهریور- آبان می‌باشد که پیک دوم آن شدت بیشتری دارد (۱). پلاسمودیوم ویواکس[1] و پلاسمودیوم فالسیپارم[2] شایع‌ترین انگلهای مالاریای منطقه را تشکیل می‌دهند (۱ و ۲). میزان آلودگی به اسپروزئیت[3] در آنوفل‌ها که نقش هرکدام از گونه‌ها در انتقال بیماری را مشخص می‌کند یکی از شاخص‌های مهم اپیدمیولوژیک است که برای برنامه‌ریزی روش‌های کنترلی و پیشگیری مالاریا متناسب با شرایط محلی ضروری است. یکی از روش‌های مرسوم و متداول تعیین آلودگی پشه‌های آنوفل به انگل مالاریا تشریح غدد بزاقی آنوفل‌های ماده صید شده با استفاده از استرئومیکروسکوپ و میکروسکوپ نوری می‌باشد. به هرحال روش مذکور بسیار پر زحمت، وقت‌گیر و از حساسیت پائینی برخوردار است. مشخص شده که سطح انگل در ناقلین مالاریا حتی در مناطقی که بیماری به صورت آندمیک وجود دارد بسیار پایین می‌باشد و از طرف دیگر با میکروسکوپ نوری نمی‌توان انگل را در نمونه‌های دارای کمتر از ۵۰۰ اسپروزوئیت مشخص کرد (۳ و ۴). به علاوه این روش نمی‌تواند با قاطعیت به تعیین گونه‌های انگل موجود در پشه بپردازد (۵).

---

[1] - *P.vivax*
[2] - *P.falciparum*
[3] - Sporozoite rate

www.SID.ir

Archive of SID

روش الیزا[1] (ELISA) کـه اسـاس آن تـشخیص پـروتئین‌هـای سطحی اسـپروزوئیت [2](CS) در پـشه‌هـای آلـوده بـا اسـتفاده از آنتی‌بادی منوکلونال می‌باشد توسـط Wirtz و همکـاران (۱۹۸۷) شرح داده شد (۵). در این روش نیز مقدار انگل باید به حد کـافی زیاد باشد بنحوی که نتایج وقتی قابل اعتماد اسـت کـه بـیش از ۱۰۰۰ اسپروزوئیت در غدد بزاقی وجود داشـته باشـد. عـلاوه بـر این، در این روش موارد مثبت کاذب در صـورتی کـه پـشه‌هـا از خون گاو و خوک تغذیه کـرده باشـند گـزارش شـده اسـت (۶). بیشترین نقطه ضعف این روش وجود CS آنتی‌ژن در سینه پـشه بدون وجود انگل می‌باشد (۷).

مناسب‌ترین جایگزین بـرای روش‌هـای میکروسـکوپی و الیـزا استفاده از روش‌های وابسته به DNA است. جدیدترین پیشرفت در زمینه تکنولـوژی نـوترکیبی [3]DNA، روشPCR مـی‌باشـد کـه بـا استفاده از آن امکان سنتز خارج سلولی[4] میلیون‌ها کپـی از سـکانس DNA هدف وجود دارد (۸). روش PCR دارای حساسیت بسیار بالا و کاملاً اختصاصی است و نه تنها گونه انگل را بلکه تنـوع ژنتیکـی بین و یا داخل جمعیت‌ها را می‌تواند مشخص نماید (۳).

مناطق خاصی از ژن‌های ریبوزومال (rDNA) بنام ssrDNA در گونه‌های مختلف انگل مالاریا دارای توالی‌های اختصاص بـه گونه می‌باشند که از این مناطق برای طراحی پرایمرهـا اسـتفاده شده است (۹). Snounou و همکاران (۱۹۹۳) از روش Nested-PCR استفاده کرده و بر اساس آن توانستند ۴ گونه انسانی انگل مالاریا را در سطح گونه شناسائی کنند (۱۰). این پرایمرهـا ابتـدا جهت تشخیص انگل در خون طراحـی و اسـتفاده شـدند و بعـد برای تشخیص آلودگی در پشه‌ها نیز با موفقیـت مـورد اسـتفاده قرار گرفت (۳و ۶ و ۷ و۱۱).

این مطالعه با هـدف اصـلی بررسـی میـزان و نـوع آلـودگی آنوفل‌ها به اسپروزوئیت انگل مالاریا برای اولین بار با اسـتفاده از روش Nested-PCR در شهرسـتان چابهـار و ایرانـشهر منطقـه بلوچستان ایران انجام گردیده است. در این بررسی از نمونه‌هـای آلوده به انگل که بـر روش میکروسـکوپی تعیـین آلـودگی شـده بودند به عنوان کنترل مثبت و نیز برای تعیین حساسیت، دقت، و اختصاصی بـودن (species-specific diagnosis) روش-Nested PCR استفاده شد.

روش کار:

جمع‌آوری نمونه: آنوفل‌ها با استفاده از روش‌های توتال کـچ[5] و هندکچ[6] از اماکن داخلی و پناهگاه‌های مصنوعی[7] و گزش شبانه (۱۲) در اواخر دو پیک انتقال بیمـاری (خـرداد و آبـان) در سـال ۱۳۸۱ در شهرسـتانهای چابهـار و ایرانـشهر جمـع‌آوری گردیـد. پشه‌های ماده صید شده پس از انتقال به آزمایشگاه با استفاده از کلید تشخیص بالغین آنوفل‌های ایران شناسایی و تفکیک شـدند (۱۳). سر و سینه نمونه‌ها از بقیـه بـدن جـدا گردیـد و در داخـل تیوب اپندورف ۱/۵ml حاوی الکـل اتـانول ۷۰ درصـد تـا زمـان انجام آزمایشات ملکولی در دمای ۴+ سانتیگراد نگهداری شـدند. نمونه‌های خون انسان آلوده به انگل از مراکز بهداشت شهرستان چابهار و ایرانشهر فراهم شدند.

استخراج DNA: DNA نمونه‌های پشه به کمک روش کـالینز با اضـافه کـردن یـک مرحلـه فنـل کلروفـرم انجـام شـد (۱۴). نمونه‌های خون آلوده را در لوله‌های محتـوی مـاده ضـد انعقـاد EDTA قرار داده وسپس در حدود ۵۰۰۰ دور دردقیقه بـه مـدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نموده، پلاسما را دور ریخته و سـپس DNA انگلهای مالاریای داخل گلبولهای قرمز با اسـتفاده از روش ذوب و انجمـاد متـوالی اسـتخراج شـدند (۱۵). DNA حاصـل در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شده و تا زمان استفاده در دمای ۴°C+ در یخچال نگهداری شدند.

واکنش‌های PCR: در این آزمایشات حجم نهایی هـر واکـنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل مواد زیر می‌باشد:

20 mM Tris Hcl, 50 m M KCl. 2.5 mM MgCl2, 0.5mM dNTPs, 1 unit Taq polymeras (Amershum), Template DNA, 1µM Primers

به منظور صرفه‌جویی در وقت و مواد مـصرفی نمونـه‌هـا بـه صورت گروهی[8] مورد آزمایش قرار گرفتند. یک میکرولیتر DNA از ۱۰ نمونه مختلـف مخلـوط شـده و سـپس از ایـن مخلـوط ۵ میکرولیتر به عنوان DNA الگو برای هر واکـنش PCR اسـتفاده شد. در صورت مثبت بودن همهٔ ۱۰ نمونه بـه صـورت جداگانـه مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. در این مرحله یک میکرولیتر از هر نمونه به عنوان DNA الگو استفاده می‌شد. برای نمونه‌های خون ۰/۵ میکرولیتر DNA به عنوان الگو استفاده می‌شد. بـرای PCR مرحلـه دوم (nested-PCR) یـک میکرولیتـر از محـصول PCR

[1] - Enzyme-linked immunosorbent assay
[2] - Cireum sporozoite protein
[3]- Recombinant DNA
[4]- In vitro

[5]- Total catch
[6]- Hand catch
[7]- Pit-shelter
[8]- Pool

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- پرایمرهای استفاده شده در هر واکنش برای تشخیص جنس پلاسمودیوم و گونه‌های پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم با غلظت استفاده شده وطول محصول PCR ایجاد شده (۱۰).

طول محصول	غلظت پرایمرها	توالی	نام	
۱۲۰۰bp	۱/۲۸ µM	5´– CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3´	rPLU5	جنس
	۱/۰۴ µM	5´– TAA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3´	rPLU6	پلاسمودیوم
۲۰۵bp	۰/۷۶ µM	5´– TTA ACCTGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT – 3´	rFAL1	گونه
	۰/۸ µM	5´– ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC - 3´	rFAL2	فالسیپاروم
۱۲۰bp	۰/۷۲ µM	5´– CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAA TGA TAC - 3´	rVIV1	گونه
	۰/۵۲ µM	5´– ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA - 3´	rVIV2	ویواکس

مرحله اول مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله اول PCR پرایمرهای rPLU5 و rPLU6 و در مرحلهٔ دوم پرایمرهای rFAL1 و rFAL2 برای تشخیص گونه پلاسمودیوم فالسیپاروم و rVIV1 و rVIV2 برای تشخیص گونهٔ پلاسمودیوم ویواکس استفاده شدند (جدول شماره ۱) (۱۰).

جهت انجام واکنشهای PCR از دستگاه ترموسایکلراپندروف[1] با برنامهٔ حرارتی شامل: ۵ دقیقه در ۹۵ °C و سپس ۲۵ سیکل (برای مرحله اول) و یا ۳۰ سیکل (مرحله دوم) حرارتی شامل ۹۴ °C بمدت یک دقیقه، ۵۸ °C بمدت۲ دقیقه و ۷۲ °C بمدت ۲ دقیقه و در نهایت بمدت ۷ دقیقه در حرارت ۷۲ °C استفاده شد. محصولات PCR در ژل آگارز[2] ۱٪ برای تشخیص جنس پلاسمودیوم و ۲٪ برای تشخیص گونه با آغشته نمودن به اتیدیوم بروماید[3] در بافر TBE الکتروفورز گردیده و سپس به کمک دستگاه[4] UV مورد بررسی و مشاهده قرار گرفتند.

یافته‌ها:

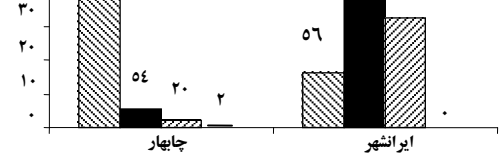
فون آنوفل‌های منطقه چابهار و ایرانشهر: بررسی‌های حشره‌شناسی به کمک کلیدهای مرفولوژیک نشان داد که در شهرستان چابهار پشه‌های آنوفل استفنسی[5] با ۹۲/۱ درصد و در شهرستان ایرانشهر آنوفل کولیسیفاسیس[6] با ۵۱/۷ درصد دارای بیشترین وفور می‌باشند. علاوه بر دو گونه ذکر شده، تنها دو گونه دیگر یعنی آنوفل پولکریموس[7] و آنوفل ساب پیکتوس[8] مجموعاً به ترتیب با ۱۰/۲ و ۰/۲ درصد در منطقه مورد مطالعه صید شدند (نمودار شماره ۱). در بین پشه‌های آنوفل صید شده از شهرستان چابهار تنها دو عدد آنوفل ساب پیکتوس وجود داشت. این گونه از حدود ۴۰ سال پیش، از منطقه حذف شده بود و هیچگونه گزارشی از وجود آن در سال‌های گذشته وجود نداشت. به دلیل اهمیت ظهور مجدد این گونه، و برای بررسی‌های بیشتر، نمونه‌های صید شده مورد بررسی‌های مولکولی جهت تعیین آلودگی به انگل قرار نگرفتند و هم اکنون این دو نمونه در موزه حشره‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری می‌شوند.

اعداد روی ستون‌ها معرف تعداد نمونه صید شده می‌باشد.

[1]- Ependorf Master Cycler
[2]- Agaros
[3]- Ethidium Bromide
[4]- ultra violet illutransluminator
[5]- *An. stephensi*
[6]- *An. Culicifacies s.l.*
[7]- *An.pulcherrimus*
[8]- *An.subpictus*

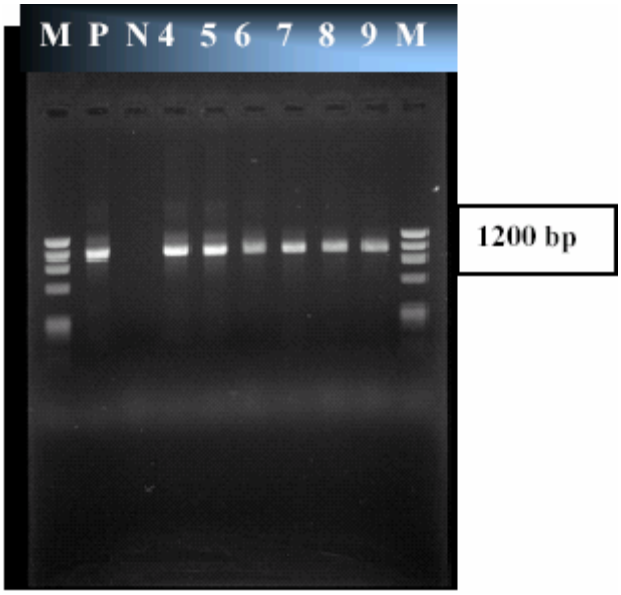
www.SID.ir

Archive of SID



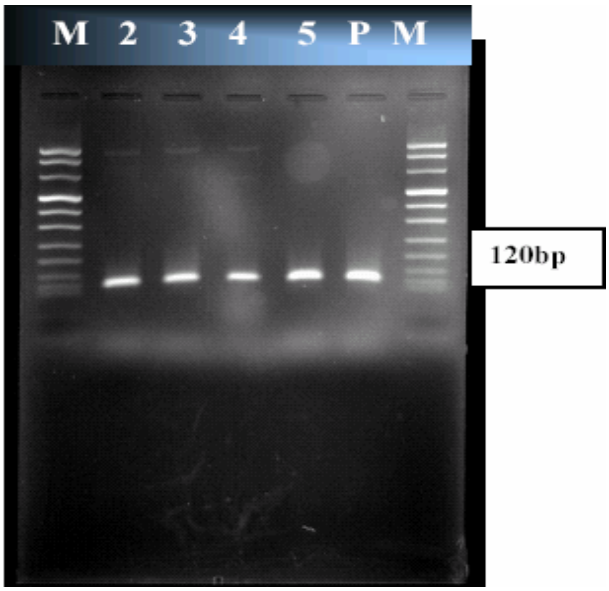
نمودار ۱- تعداد و درصد فراوانی گونه‌های آنوفل صید شده در شهرستان چابهار و ایرانشهر سال ۱۳۸۱

تعیین آلودگی به انگل مالاریا به روش Nested-PCR: در این مطالعه ۱۲۹۴ پشه آنوفل مورد بررسی و آزمایشات Nested-PCR قرار گرفتند. این بررسی‌ها نشان دادند که تنها دو نمونه آنوفل استفنسی آلوده به اسپروزوئیت از گونه پلاسمودیوم ویواکس وجود داشتند. نتایج آزمایشات در مرحله اول PCR نشان دادند که نمونه‌های آلوده یک باند به طول حدود ۱۲۰۰bp در امتداد نمونه‌های خون کنترل مثبت آلوده به پلاسمودیوم تولید نمودند (شکل ۱) به دنبال انجام مرحله دوم PCR، نمونه‌های مثبت باندی به طول حدود ۱۲۰bp تولید نمودند (شکل ۲) که این باندها هم در امتداد نمونه‌های خون کنترل مثبت آلوده به پلاسمودیوم ویواکس بودند. در آزمایشات انجام گرفته بر روی پشه‌ها، هیچگونه آلودگی به پلاسمودیوم فالسیپاروم ویا آلودگی توام فالسیپاروم و ویواکس مشاهده نشد.



شکل ۱- باندهای حاصل از PCR مرحله اول (اختصاص به جنس پلاسمودیوم) بطول حدود ۱۲۰۰ bp در سر و سینه پشه‌های آلوده به انگل مالاریا متعلق به شهرستان چابهار بلوچستان ایران. M= مارکر IX متعلق به شرکت Roche (طول ۳ باند اول مارکر از بالا به پایین: ۱۳۵۳ و ۱۰۷۸ و ۸۷۲)، P= کنترل مثبت، N= کنترل منفی، ۹-۴= باندهای مربوط به نمونه سر و سینه پشه‌های آلوده به انگل (توجه: باندهای ۹-۶ تکراری هستند)

بررسی‌های انجام شده بر روی خون‌های انسانی آلوده به انگل مالاریا مشخص شد که ۹۳٪ نمونه‌ها (۱۳ عدد از ۱۴ نمونه) آلوده به پلاسمودیوم ویواکس بودند. تنها یکی از نمونه‌ها دارای آلودگی توام به فالسیپاروم و ویواکس بودند (شکل شماره ۳). این نمونه در مطالعات میکروسکوپی تنها آلوده به پلاسمودیوم فالسیپاروم گزارش شده بود.



شکل ۲- باندهای حاصل از PCR مرحله دوم (اختصاص به گونه پلاسمودیوم ویواکس) بطول حدود ۱۲۰ bp در سر و سینه پشه‌های آلوده به انگل مالاریا متعلق به شهرستان چابهار بلوچستان ایران. M= مارکر VIII متعلق به شرکت Roche (طول باندهای مارکر از بالا به پایین: ۱۱۱۴ و ۹۰۰ و ۶۹۲ و ۴۸۹/۵۰۱ و ۴۰۴ و ۳۲۰ و ۲۴۲ و ۱۹۰ و ۱۴۷ و ۱۲۴ و ۱۱۰ و۶۷ و ۱۹/۲۶/۳۴/۳۴/۳۷)، P= کنترل مثبت، ۵-۲= باندهای مربوط به نمونه پشه‌ها (توجه: باندهای ۵-۴ تکراری هستند)

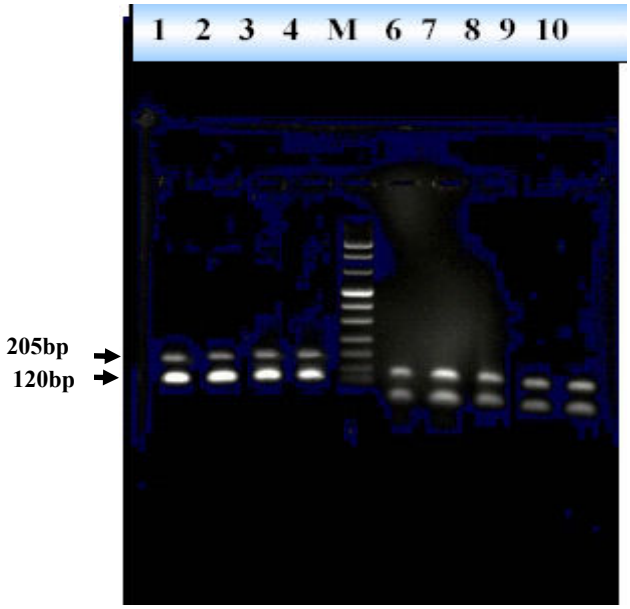
بحث و نتیجه‌گیری:

آگاهی از ترکیب گونه‌های آنوفل و میزان اسپروزوئیت در غدد بزاقی آنها به کمک روش‌های مطمئن و حساس امری حیاتی و اجتناب ناپذیر جهت برنامه‌ریزی روش‌های کنترل و پیشگیری بیماری مالاریا می‌باشد. نتایج بدست آمده از ترکیب گونه‌های پشه‌های صید شده نشان داد در شهرستان ایرانشهر آنوفل کولیسیفاسیس و در شهرستان چابهار آنوفل استفنسی دارای بیشترین وفور می‌باشند. شرایط آب و هوایی کاملاً متفاوت این دو شهرستان عامل اصلی این اختلاف می‌باشد. شهرستان

www.SID.ir

Archive of SID

چابهار دارای آب و هـوای سـاحلی اسـت در حالیکـه شهرسـتان ایرانشهر دارای آب و هوای دشت و کوهپایه می‌باشد. نتایج ایـن مطالعـه بـا نتـایج مطالعـات قبلـی مبنـی بـر اینکـه آنوفـل کولیسیفاسیس گونه غالب شهرستان ایرانشهر می‌باشد مطابقـت



شکل ۳- باندهای حاصل از PCR مرحله دوم (اختصاص به گونه) برای نمونه خون انسان مثبت باآلودگی توأم و نمونه خون انسان مثبت با آلودگی به ویواکس. M= مارکر VIII متعلق به شرکت Roche (طول باندهای مارکر از بالا به پایین: ۱۱۱۴ و ۹۰۰ و ۶۹۲ و ۴۸۹/۵۰۱ و ۴۰۴ و ۳۲۰ و ۲۴۲ و ۱۹۰ و ۱۴۷ و ۱۲۴ و ۱۱۰ و۶۷ و ۱۹/۲۶/۳۴/۳۴/۳۷)، ۴-۱= نمونه خون با آلودگی مخلوط (۲۰۵ bp پلاسمودیوم فالسیپاروم و ۱۲۰ bp پلاسمودیوم ویواکس) ۱۰-۶= نمونه خون آلوده به پلاسمودیوم ویواکس

دارد (۱۶و ۱۷). امـا ایـن وضـعیت در مـورد شهرسـتان چابهـار متفاوت می‌باشد. این اختلاف نتایج می‌تواند مربـوط بـه وسـعت منطقه مورد مطالعه باشد زیرا مطالعات انجام شده قبلی بیشتر در بخش قصرقند شهرستان ایرانشهر انجام گرفته و به کل منطقـه تعمیم داده شده است. دلیل احتمالی دیگر این وضعیت می‌توانـد مربوط به کاهش فـشار سمپاشـی در امـاکن داخلـی شهرسـتان چابهار باشد که باعث افزایش میزان وفور آنوفـل استفنـسی کـه علاقه زیادی به فعالیت در مناطق مسکونی انـسانی و حیـوانی و نیز استراحت در اماکن داخلی دارد[1] شده باشد.

در این تحقیق، آلودگی پشه‌ها و یا خـون انـسانی آلـوده بـه انگل مالاریا حتی به صورت تـوام تـا سـطح گونـه تعیـین شـد. آلودگی توأم بوسیله دو و یا بـیش از دو گونـه پلاسـمودیوم، هـر چند نسبتا کم، در تمام مهره داران میزبان انگل مالاریـا گـزارش شده است (۱۸). در این مطالعـه نیـز درصـد کمـی از نمونـه‌هـا آلودگی مخلوط داشـتند کـه ایـن میـزان آلـودگی بـا اطلاعـات اپیدمیولوژیک موجود در منطقه بلوچستان همـاهنگی دارد (۲۱-۱۹). مطالعات قبلی بیان می‌کنند که یک خاصـیت آنتاگونیـستی بین گونه‌های انگل مالاریا در آلودگی‌های مخلـوط وجـود دارد و هر گونه تمایل به غلبه بر سـایر گونـه‌هـا را دارد (۲۲و۲۳). ایـن وضعیت باعث مـی‌شـود کـه در مطالعـات میکروسـکوپی مـوارد مخلوط کمتر مـشاهده و گـزارش شـود، در حالیکـه روش PCR می‌تواند مقادیر نـاچیز DNA را بـصورت میلیـونی تکثیـر داده و آلودگی‌های مخلوط را به خوبی نشان دهـد. تـشخیص آلـودگی توأم نه تنها برای درمان موفقیت‌آمیـز بیمـاران و ارزیـابی تـأثیر روش‌های درمان و کنترل بیماری، بلکه برای تعیین میزان دقیق وفور گونه‌های مالاریـا و متعاقبـاً بـرای تعیـین پتانـسیل انتقـال بیماری اهمیت دارد.

نتایج این مطالعه نشان داد که انگل پلاسـمودیوم ویـواکس گونه غالب مالاریا در منطقه می‌باشد که با نتایج حاصل از سـایر مطالعات که به روش‌های میکروسکوپی و مونوکلونال آنتی‌بـادی انجام شده مطابقـت دارد (۱۷و۲۱-۱۹). در مقایـسه محـصولات PCR نمونه‌هایی که آلودگی مخلوط بـه گونـه‌هـای ویـواکس و فالسیپاروم داشتند مشاهده شـد کـه محـصول PCR مربـوط بـه ویواکس قوی‌تر از محصول PCR مربـوط بـه فالـسیپاروم اسـت (شکل ۳). با توجه به اینکه این نمونه در مطالعات میکروسکوپی آلوده به فالسیپاروم گزارش شده بود، حدس زده می‌شود علت آن مربوط به فاکتورهایی از قبیل بهتر عمل نمودن جفت پرایمرهای اختصاصی ویواکس در مقایسه بـا فالـسیپارم، تـشخیص اشـتباه میکروسکوپیست، و یا وفور بیشتر ویواکس و بالطبع غلظت بالاتر DNA آن نسبت به فالسیپاروم در نمونـه مـذکور باشـد. توصـیه می‌شود برای نتیجه‌گیری صحیح‌تر و مطمئن‌تر آزمایشات کمـی دقیقی از جمله PCR کمی صورت پذیرد.

این مطالعه نشان داد که روش Nested-PCR را می‌توان بـه سهولت برای تعداد زیادی نمونه‌های صحرایی استفاده نمـود. در این روش نیازی به تشریح غدد بزاقی نیست و حتی نمونـه‌هـای خشک شده و قدیمی را می‌توان مورد بررسی قـرار داد. بنـابراین نیاز به تجهیز آزمایشگاه‌ها و اعزام پرسـنل بـه منـاطق آنـدمیک

[1] - Endophilic

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری نبوده و نمونه‌های جمع‌آوری شده در منطقه را می‌توان در آزمایشگاه‌های مرکزی مورد آزمایش قرار داد.

در این روش تنها ۱۰ درصد DNA استخراج شده سر و سینه پشه‌ها استفاده شد و از بقیه بدن پشه و DNA موجود می‌توان برای سایر مطالعات از جمله بررسی ژنتیک جمعیت و یا تعیین

سیبلینگ‌های گونه‌های کمپلکس آنوفلها، مقاومت به سموم و میزان آنتروپوفیلی آنوفل‌ها به روش‌های ملکولی و غیرملکولی استفاده نمود. همچنین در این تحقیق از یک روش نسبتاً ارزان و آسان جهت استخراج DNA و آزمایش دسته‌جمعی DNA نمونه‌ها استفاده می‌شود که انجام چنین مطالعاتی را آسان و اقتصادی می‌نماید.

نتایج این تحقیق و سایر محققین نشان می‌دهد که روش Nested–PCR دارای حساسیت بسیار بیشتری نسبت به روش‌های میکروسکوپی و الیزا می‌باشد (۷–۴ و۱۰و۱۱). Wilson و همکاران (۱۹۹۸) بیان می‌کنند که حساسیت روش PCR ۳ برابر روش میکروسکوپی است (۴). همچنین Vythilingam و همکاران (۱۹۹۹) جهت تشخیص پلاسمودیوم ویواکس حساسیت روش PCR را ۱۰۰٪ و روش الیزا را ۳۷٪ گزارش می‌کنند (۷). در روش میکروسکوپی و الیزا حداقل بایستی به ترتیب ۵۰۰ و ۱۰۰۰ اسپروزوئیت در غدد بزاقی وجود داشته باشد که با اطمینان آن را تشخیص داد در حالیکه با روش PCR می‌توان نمونه‌های دارای ۱۰ اسپروزوئیت را با ۱۰۰٪ اطمینان تشخیص داد (۳). همچنین بیان شده که در صورت دقت عمل، این روش قادر است نمونه‌های دارای یک اسپروزوئیت را نیز به راحتی تشخیص دهد (۳).

باتوجه به نتایج بدست آمده و نیز به دلیل محدودیت‌های موجود در این طرح و اهداف دیگری که از آن دنبال می‌شد، پیشنهاد می‌شود که مطالعات جامع و مستقل حشره‌شناسی و اپیدمیولوژیک بیماری مالاریا در مناطق جنوب شرقی کشور به تفکیک شهرستان انجام پذیرد.

به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی با توجه به کشف موارد مثبت آنوفل استفنسی در شهرستان چابهار و نیز وفور بسیار بالایی که این گونه نسبت به سایر گونه‌ها دارد به نظر می‌رسد نقش اصلی را در انتقال بیماری مالاریا در چابهار به عهده داشته باشد و لذا در برنامه‌ریزی‌های کنترل بیماری، بایستی با آن به عنوان گونه ناقل اصلی منطقه برخورد شود. در بسیاری از مناطق مالاریا خیز کشور گونه‌های از آنوفل به عنوان ناقلین ثانویه یا مشکوک نام برده می‌شود که با توجه به حساسیت روش Nested- PCR توصیه می‌شود از این روش ملکولی جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین ناقلین مالاریا در آن مناطق استفاده شود.

تشکر و قدردانی:

بدین‌وسیله از جناب آقای وطن‌دوست مدیر اسبق گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده بهداشت، دکتر زند رئیس شبکه بهداشت شهرستان چابهار، مسئولین و پرسنل محترم مرکز بهداشت چابهار بویژه آقای دکتر مهدی‌زاده، آقای مهندس زارعیان و همکاران که در مرحله نمونه‌گیری مساعدت فراوان نمودند تشکر می نماییم. همچنین از جناب آقای دکتر حیدرنیا مسئول محترم مرکز تحقیقات چابهار و همکارانشان به جهت تهیه امکانات در مسافرتها به شهرستان چابهار و از مسئولین و پرسنل محترم مرکز تحقیقات بهداشتی ایرانشهر بویژه آقای مهندس اکبرزاده به جهت همکاری در تهیه نمونه‌ها از شهرستان ایرانشهرکمال تقدیر و تشکر را می‌نماییم.

منابع:

۱- اداره کل مبارزه با با بیماریهای واگیر. گزارش انتشار بیماری مالاریا در ایران در سال ۱۳۸۰ (منتشر نشده).

2- Sadrizadeh B. Malaria in the world in the Eastern Mediterranean region and in Iran. WHO/EMRO Report: 1-13; 1999. Available at: http://pearl.sams.ac.ir/AIM/9924/sadrizadeh9924.html

3- Arez AP, Lopes D, Pinto J, et al. Plasmodium sp.: Optimal protocols for PCR detection of low parasite members from mosquito (Anopheles sp.) samples; Experiment Parasitol 2000; 94: 269-72.

4- Wilson, MD, Ofosu-Okyere A, Okoli AU, et al. Direct comparison of microscopy and polymerase chain reaction for the detection of Plasmodium sporozoites in salivary glands of mosquitoes. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998; 92: 482-3.

5- Lombardi S, Esposito F, Zavala P. Detection and anatomical location of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein and sporozoites in the Afrotropical malaria vector Anopheles gambiae s.l. Am J Trop Med Hyg 1987; 37: 491-494 .

6- Povoa MM, Machado RL, Segura MN, et al. Infectivity of malaria vector mosquitoes: correlation of positivity between ELISA and PCR-ELISA tests. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 106-7.

www.SID.ir

Archive of SID

7- Vythilingam I, Nitiavathy K, Yi P, et al; A highly sensitive nested polymerase chain reaction based method using simple DNA extraction to detect malaria sporozoites in mosquitoes. Southeast Asian J Trop Med Public health 1999; 30(4): 631-5.

8- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymat amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-91.

9- Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, et al. Identification of the human parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Bioch Parasitol 1993; 58: 283-92.

10- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensivity of detection of human malaria parasites by use of nested PCR amplification. Mol Bioch Parasitol 1993; 61: 315-20.

11- Perandin F, Manca N, Piccolo G, et al. Identification of Plasmodium falciparum, P. vivax, P. ovale and P. malariae and detection of mixed infection in patients with imported malaria in Italy. New Microbiol 2003; 26(1):91-100.

12- World Health Organization. Manual on Practical Entomology in Malaria. Part I & II. Methods and Techniques. Geneva WHO Offset Publication No 13; 1975.

13- Shahgudian ER. A key to the Anophelines of Iran. Acta Medica Iranica 1960, 3: 38-48.

14- Collins FA, Mendez MA, Rasmussen MO, et al. A ribosomal RNA gene probe differentiates members species of Anopheles gambiae complex. Am J Trop Med Hyg 1987; 37: 37-41.

15- Contamin H, Fandeur T, Rogier C. Different genetic characteristics of Plasmodium falciparum isolates collected during successive clinical malaria episodes in Senegalese children. Am J Trop Med Hyg 1996; 54(6): 633-43.

16- Zaim M, Manouchehri AV, Motabar M, et al. Anopheles culicifacies in Baluchistan, Iran. Med Vet Ent 1995; 9: 181-6.

17- Zaim M, Subbarao SK, Manouchehri AV, et al. Role of Anopheles culicifacies s.l. and An. pulcherrimus in malaria transmission in Ghassreghand (Baluchistan), Iran. J Am Mosq Control Assoc 1993; 9: 23-6.

18- Richie TL. Interation between malaria parasites infecting the same vertebrate host. Parasitol 1988; 96: 607-39.

19- Manouchehri AV, Zaime M, Emadi AM. A review of malarian in Iran (1975-1990). J Am Mosq Control Assoc 1992; 8(4): 381-85.

۲۰- ادریسیان، غلامحسین. مروری بر وضعیت مالاریا در ایران، مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، سال ۱۳۸۱، شماره ۱، ص ۶۱-۵۰.

۲۱- قوامی، م و همکاران. آلودگی به اسپروزوئیت در آنوفلهای بخش قصرقند بلوچستان ایران. مجله بهداشت ایران. سال بیست و ششم، شماره ۴-۳. صفحه ۲۰-۹. ۱۳۷۶.

22- Boyd MF, Kitchen SF. Simultaneous inoculation with Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum. Am J Trop Med 1937; 17: 855-61.

23- Mayne B, Young MD. Antagonism between species of malaria parasites in induced mixed infections. Pub Health Rep Washington 1938; 53: 1289-91.

www.SID.ir