

بررسی دوز موثر دافع حشرات دی متیل فتالات (ایرانی و خارجی) در مقابل

Anopheles stephensi و *Culex pipiens* با استفاده از متد استاندارد و مدل اصلاح شده

مهدی خویدل^{۱*}، محمدعلی عشاقی^۲ Ph.D.، محمدرضا آخوند^۳ MS.C.، یونس پناهی^۴ Ph.D.

رمضانعلی عطایی^۵ Ph.D.، حامد رمضانی^۶ MS.C.

آدرس مکاتبه: *دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، تهران، ایران.

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۵/۶/۳۰

تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۸۵/۳/۲۳

تاریخ اعلام وصول: ۸۴/۱۰/۲۵

خلاصه

مقدمه: هر چند در طی چند دهه اخیر، دی اتیل متا تولوآمید (DEET) به عنوان پرمصرف ترین و موثرترین ماده دافع حشرات مطرح بوده است، اما اثرات زیانبار سمی و آلرژیک آن باعث شده است که ایده جایگزینی مواد دافع دیگر به جای آن قوت گیرد. در این بین ماده دی متیل فتالات (DMP) که در طی سالهای دور به عنوان دافع حشرات مورد مصرف بوده، در سالهای اخیر نیز مجدداً مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه حاضر در نظر دارد ویژگی فنی DMP ایرانی و خارجی را از لحاظ دوز موثر (ED50, ED95) با استفاده از دو متد استاندارد و اصلاح شده مورد بررسی و مقایسه قرار دهد.

مواد و روش کار: در این مطالعه دوز موثر DMP ساخته شده در ایران و DMP خارجی (ساخت شرکت Merck) با استفاده از متد استاندارد (ASTM) و متد اصلاح شده در مقابل دو گونه *Anopheles stephensi* و *Culex pipiens* با استفاده از داوطلب انسانی مورد بررسی قرار گرفت. در متد استاندارد در هر با تست ۴ غلظت از ماده دافع به همراه شاهد به طور هم زمان مورد آزمایش قرار گرفت، در حالی که در مدل اصلاح شده در هر بار فقط یک دوز از ماده دافع تست گردید. در نهایت تفاوت‌های موجود در بین DMP ایرانی و خارجی و نیز اختلاف موجود در نتایج دو متد فوق با استفاده از آنالیز رگرسیون پروبیت (Probit) در نرم‌افزار SAS (Statistical Analysis System) و آزمونهای آنالیز واریانس و T-test با یکدیگر مقایسه شد.

نتایج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از لحاظ دوز موثر اختلاف معنی داری بین DMP ایرانی و خارجی وجود ندارد. ولی بین دو متد تست از لحاظ دامنه ED50-ED95 اختلاف وجود دارد. به طوری که در متد اصلاح شده این دامنه گسترده تر شده، فاصله ED50 تا ED95 زیاده‌تر می‌شود. همچنین در این مطالعه تفاوت‌هایی نیز بین دو گونه پشه مورد تست از لحاظ دوز موثر و میزان دورکنندگی مشاهده شد.

بحث: بر طبق این یافته‌ها، DMP سنتز شده در ایران قابلیت رقابت و پتانسیل جایگزینی بجای DMP خارجی را دارد. همچنین هر دو متد استاندارد و اصلاح شده دارای معایب و محاسنی هستند، ولی با توجه به این یافته‌ها به نظر می‌رسد برای تست مواد دافع حشرات، متد استاندارد مناسب‌تر از متد اصلاح شده باشد؛ علاوه بر این تعیین دوز موثر مواد دافع حشرات، پشه *Anopheles stephensi* مناسب‌تر از *Culex pipiens* می‌باشد.

واژگان کلیدی: دی متیل فتالات، DMP، دوز موثر، مواد دافع حشرات، *Anopheles stephensi*، *Culex pipiens*

۱- استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) - پژوهشکده طب رزمی - مرکز تحقیقات بهداشت نظامی.
۲- استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران - دانشکده بهداشت - گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین.
۳- دانشجوی Ph.D. آمار حیاتی - دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده پزشکی - گروه آمار.
۴- استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) - پژوهشکده طب رزمی - مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی.
۵- استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) - پژوهشکده طب رزمی - مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی.
۶- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی تهران - دانشکده بهداشت - گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین.

مقدمه

امروزه استفاده از مواد دافع حشرات به عنوان یکی از روش های مهم برای کاهش سرایت بیماری های منتقله به وسیله بندپایان مورد توجه قرار گرفته است [۱]. ماده دی اتیل متا تولوآمید یا دیت (DEET) یکی از پرمصرف ترین مواد دافع می باشد که در جنگ جهانی دوم و پس از آن مرسوم شده است [۲]. هر چند دیت یک دافع پر مصرف و بسیار موثر و کارآمد است، اما اثرات سمی و آلرژیک آن باعث گردیده، فکر جایگزین کردن مواد دافع دیگر به جای آن قوت گیرد [۳؛۴]؛ در این راستا مواد دافع حشرات با منشا گیاهی که عمدتاً از عصاره ها و روغن های گیاهان تهیه می شود، توجه محققین را به خود جلب نموده است [۵؛۶]. استفاده از عصاره های گیاهی به عنوان دافع حشرات در مقابل پشه های ناقل بیماری مالاریا از جمله آنوفل گامبیه (*Anopheles gambiae*) در کشور کنیا و آنوفل استنفنسی (*An. stephensi*) در کشور هندوستان بسیار رضایت بخش بوده است [۷؛۸]. همچنین استفاده از عصاره گیاه زردچوبه (*Curcuma aromatic*) در کشور تایلند در مقابل آئدس توگوی (*Aedes togoi*) که ناقل بیماری فیلاریازیس (Filariasis) در کشورهای آسیای شرقی است، در حدود ۳/۵ ساعت ایجاد حفاظت نموده است [۹، ۱۰]. در سال های اخیر استفاده از مواد دافع گیاهی در ترکیب با مواد دافع شیمیایی بیش از پیش مطرح گردیده است [۱۱]. علاوه بر این، برخی مواد دافع شیمیایی از قبیل دی متیل فتالات (DMP) که در گذشته مصرف زیادی داشته، امروزه مجدداً مورد توجه قرار گرفته است [۱۲، ۱۳]. از زمانی که خاصیت دورکنندگی DMP کشف شد، این ماده اغلب به صورت ترکیب با سایر دورکننده ها مورد استفاده قرار گرفته است. برای مثال در ارتش آمریکا در طول جنگ جهانی دوم و قبل از آن از ترکیبی به نام M-250 استفاده می شد که مخلوطی از DMP (۶ قسمت)، اتیل هگزان دیول (۲ قسمت) و ایندولان (۲ قسمت) می باشد. این ترکیب که به مخلوط ۶۲۲ نیز مشهور بود، معمولاً به صورت ۵۰٪ مورد استفاده قرار می گرفت [۱۴]. در سال های بعد ترکیب جدیدی تحت عنوان M-2020

جایگزین ترکیب فوق شد که مخلوطی از DMP (۴ قسمت)، اتیل هگزان دیول (۳ قسمت) و دی متیل کاربات (۳ قسمت) بود [۱۵]. در آن زمان هر دو ترکیب M-250 و M-2020 به صورت موضعی بر روی پوست استفاده می شدند. البته در مواردی نیز برای آغشته سازی لباس ها از این ترکیبات استفاده شده است [۱۶]. مطالعه حاضر در نظر دارد ویژگی فنی DMP ایرانی و خارجی را از لحاظ دوز موثر (ED₅₀, ED₉₅) با استفاده از متد استاندارد و متد اصلاح شده مورد بررسی قرار داده، نتایج حاصل از دو متد تست را با یکدیگر مقایسه نماید و در نهایت میزان دورکنندگی دی متیل فتالات در مقابل دو گونه پشه *An. stephensi* و *Cx. pipiens* مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش کار

تحقیق حاضر یک مطالعه تجربی (experimental) شاهد-موردی است و براساس متد استاندارد تست مواد دورکننده که توسط آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (US EPA) تنظیم شده، طراحی و اجرا گردید.

تهیه مواد دافع مورد نیاز و مواد مؤثره آنها: ماده مؤثره DMP (active ingredient) ساخت داخل از گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد و ماده مؤثره DMP خارجی با درجه خلوص ۹۹٪ از شرکت Merck خریداری گردید.

مدل های تست با استفاده از ورق های شفاف پلاستیکی (Cast acrylic sheet)، ساخت شرکت تایوانی Jiuh Mei و مطابق طرح های ارائه شده توسط US EPA به شکل مکعب مستطیل و در ابعاد توصیه شده ۱۸×۴×۵ سانتی متر به دو شکل استاندارد و اصلاح شده ساخته شد (شکل های ۱ و ۲).

روش تست آزمایشگاهی: در بررسی حاضر از روش های استاندارد ASTM E951-83 و ASTM E951-94 [۱۷] و همچنین روش اصلاح شده آن (ASTM modified) [۸] استفاده شد. علاوه بر این، بر اساس توصیه US EPA و مطالعات قبلی تعداد ۴ نفر داوطلب (همگی مرد) به عنوان سوژه انسانی (Human subjects) انتخاب شدند. ارزشیابی مواد دورکننده نیز



شکل ۲: برآورد دوز مؤثر با استفاده از متد استاندارد ASTM.

آنالیز داده‌ها (Data Analysis)

برای برآورد نمودن دوزهای مؤثر ۵۰٪ و ۹۵٪ (ED_{50} , ED_{95}) از آنالیز رگرسیون پروبیت (Probit) در نرم‌افزار SAS (Statistical Analysis System) استفاده شد. برای مقایسه متدهای تست، گونه‌های پشه‌های مورد تست و نیز دو نوع ماده دافع دی متیل فتالات ایرانی و خارجی از آنالیز واریانس و T-test استفاده گردید.

نتایج

تعیین دوزهای مؤثر ۵۰٪ و ۹۵٪ (ED_{50} , ED_{95}) با استفاده از متد استاندارد ASTM

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری در ED_{50} ماده مؤثره DMP ایرانی و DMP خارجی چه در مقابل آنوفل استغفنی و چه در مقابل کولکس پی‌پینس، وجود ندارد ($p > 0/05$). در این مطالعه ED_{50} دافع DMP ایرانی و خارجی در مقابل آنوفل استغفنی به ترتیب $2/13$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) و $1/91$ و در مقابل کولکس پی‌پینس به ترتیب $1/59$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) و $1/45$ به دست آمد (جدول ۱).

در مطالعه حاضر، در مقایسه ED_{95} ماده مؤثره DMP ایرانی و خارجی نیز چه در مقابل آنوفل استغفنی و چه در مقابل کولکس پی‌پینس، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). میزان ED_{95} دافع DMP ایرانی و خارجی در مقابل آنوفل استغفنی به ترتیب $25/12$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) و $23/33$ و در مقابل کولکس پی‌پینس به ترتیب $7/24$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) و $6/89$ می‌باشد (جدول ۱).

با استفاده از دو گونه پشه آنوفل استغفنی سوش هندی و کولکس پی‌پینس سوش تهران صورت گرفت. پرورش پشه‌ها در آزمایشگاه تحت دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۷۰-۸۰ درصد انجام شد.

با استفاده از الگو، ۵ دایره در اندازه ۲۹ میلی متر بر روی ساعد داوطلبین ترسیم شد. سپس بر طبق روش استاندارد برای به دست آوردن دوز مؤثر مواد دورکننده (Effective dose) رقت‌های مورد نظر از ماده دافع در اتانول خالص (پیور) تهیه شد و یک رقت از شاهد (اتانول خالص) و ۴ رقت مختلف (سریال) از دافع به اندازه ۲۵ میکرولیتر با استفاده از سمپلر و به صورت تصادفی در داخل دایره‌های ترسیم شده بر روی ساعد اضافه گردید. البته در روش اصلاح شده در هر بار فقط یک دوز (غلظت) از ماده دافع برای تست انتخاب می‌شد و کلیه دایره‌های ۲۹ میلی متری فقط با آن آغشته می‌گردید. آنگاه تعداد ۱۵-۱۰ پشه ماده ۵-۱۵ روزه و خون‌نخورده، به داخل کیج وارد نموده، کیج بر روی ساعد داوطلب بسته و کشویی آن باز می‌شد تا نقاط آغشته در معرض گزش پشه‌ها قرار گیرد (شکل ۲). در نهایت تعداد گزش‌ها در هر دایره در مدت ۵ دقیقه شمارش می‌شد.



شکل ۱: نمونه قفس تست مورد استفاده در متد اصلاح شده. در این روش قفس تست به ۵ خانه مجزا و مساوی تقسیم می‌گردد.

نتایج حاصل از بررسی دوز مؤثر در مدل اصلاح شده نشان داد که ED₉₅ دافع DMP ایرانی و خارجی در مقابل آنوفل استفسنی به ترتیب $(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ ۳۴/۵۴ و ۲۹/۷۴ و در مقابل کولکس پی پینس به ترتیب $(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ ۲۱/۶۰ و ۱۰/۰۸ می باشد که در مقایسه ED₉₅ ماده مؤثره DMP ایرانی و خارجی نیز چه در مقابل آنوفل استفسنی و چه در مقابل کولکس پی پینس، اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) (جدول ۲).

در هر یک از متدهای مورد مطالعه، ترسیم نمودارهای لگاریتمی تفاوت های کمی را در شیب خط های رگرسیون دو نوع DMP ایرانی و خارجی نشان می دهد. ولی اختلاف نسبتاً زیادی در مقایسه شیب خط های دو متد استاندارد و مدل اصلاح شده قابل مشاهده است (نمودارهای ۱-۴).

تعیین دوزهای مؤثر ۵۰٪ و ۹۵٪ (ED₅₀, ED₉₅) با استفاده از متد اصلاح شده (Modified ASTM) با دوز منفرد

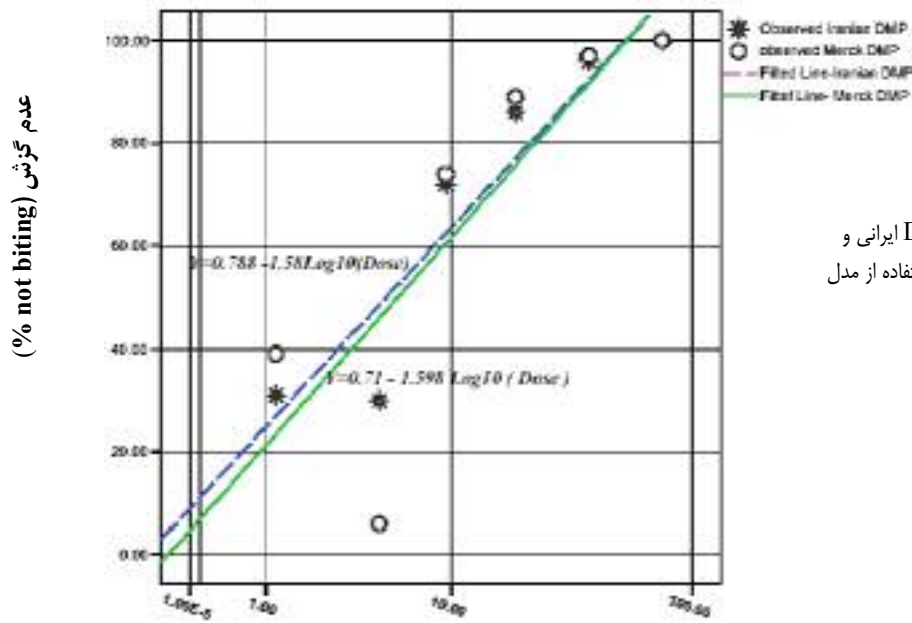
نتایج حاصل از مطالعه با مدل کیج (cage) اصلاح شده نشان می دهد که مابین ED₅₀ ماده مؤثره DMP ایرانی و خارجی در مقابل آنوفل استفسنی اختلاف معنی داری وجود ندارد ($p > 0.05$). در این مطالعه ED₅₀ دافع DMP ایرانی و خارجی در مقابل این گونه به ترتیب $(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ ۳/۱۵ و ۲/۷۸ به دست آمد. در این متد مقایسه نتایج ED₅₀ دافع DMP ایرانی و خارجی در مقابل کولکس پی پینس اختلاف معنی دار نشان می دهد ($p < 0.05$) که احتمالاً یک نوع خطا ناشی از تمایل کمتر کولکس پی پینس به گزش می باشد. در این متد ED₅₀ پماد سنگر در مقایسه با DMP ایرانی و خارجی اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد ($p > 0.05$).

جدول ۱: مقایسه دوز مؤثر (Effective dose) مواد دافع مختلف با استفاده از متد استاندارد ASTM

گونه	ED ₅₀ مواد دافع $(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ (CI %۹۵)		ED ₉₅ مواد دافع $(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ (CI %۹۵)	
	DMP خارجی	DMP ایرانی	DMP خارجی	DMP ایرانی
<i>An. stephensi</i>	۱/۹۱	۲/۱۳	۲۲/۲۳	۲۵/۱۲
	(۱/۴۴-۲/۳۶)	(۰/۵۸-۵/۰۶)	(۱۴/۶۶-۵۰/۸۹)	(۷/۸۸-۸۴/۴)
<i>Cx. pipiens</i>	۱/۴۵	۱/۵۹	۶/۸۹	۷/۲۴
	(۱/۰۱ - ۶/۲۸)	(۰/۵۱-۴/۵۶)	(۳/۲۵ - ۲۷/۸۰)	(۳/۱۹-۲۴/۵۵)

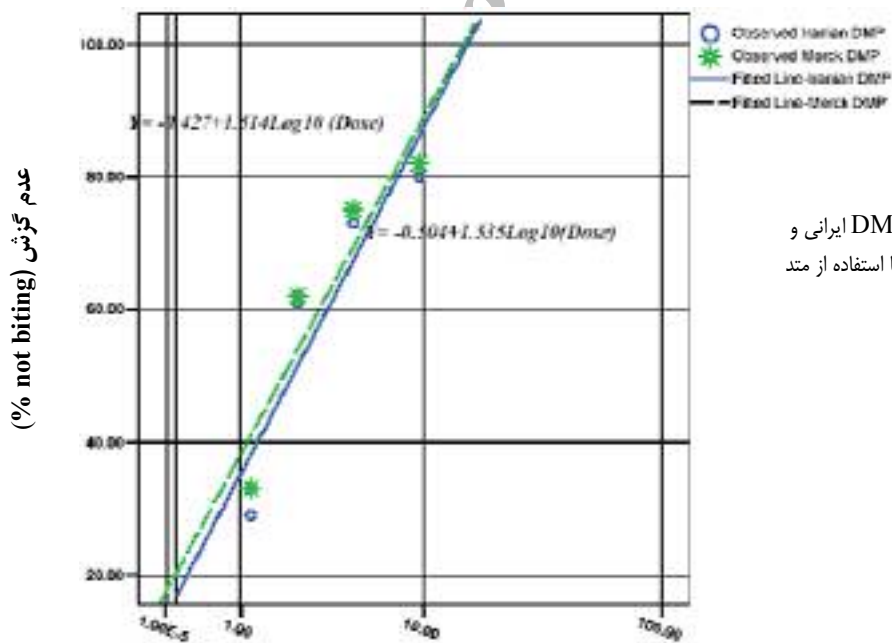
جدول ۲: مقایسه دوز مؤثر (ED)، DMP ایرانی با مشابه خارجی با استفاده از متد اصلاح شده.

گونه	ED ₅₀ مواد دافع $(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ (CI %۹۵)		ED ₉₅ مواد دافع $(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ (CI %۹۵)	
	DMP خارجی	DMP ایرانی	DMP خارجی	DMP ایرانی
<i>An. stephensi</i>	۲/۷۸	۳/۱۵	۲۹/۷۴	۳۴/۵۴
	(۱/۲۳-۴/۵۵)	(۱/۵۲-۵/۰۰)	(۱۶/۸۰-۸۶/۶۱)	(۱۹/۲۶-۱۰۵/۷۵)
<i>Cx. pipiens</i>	۰/۴۲	۳/۴۴	۱۰/۰۸	۲۱/۶۰
	(۰/۲۴-۰/۵۹)	(۱/۵۰-*)	(۶/۲۶-۲۳/۰۶)	(۱۴ - *)



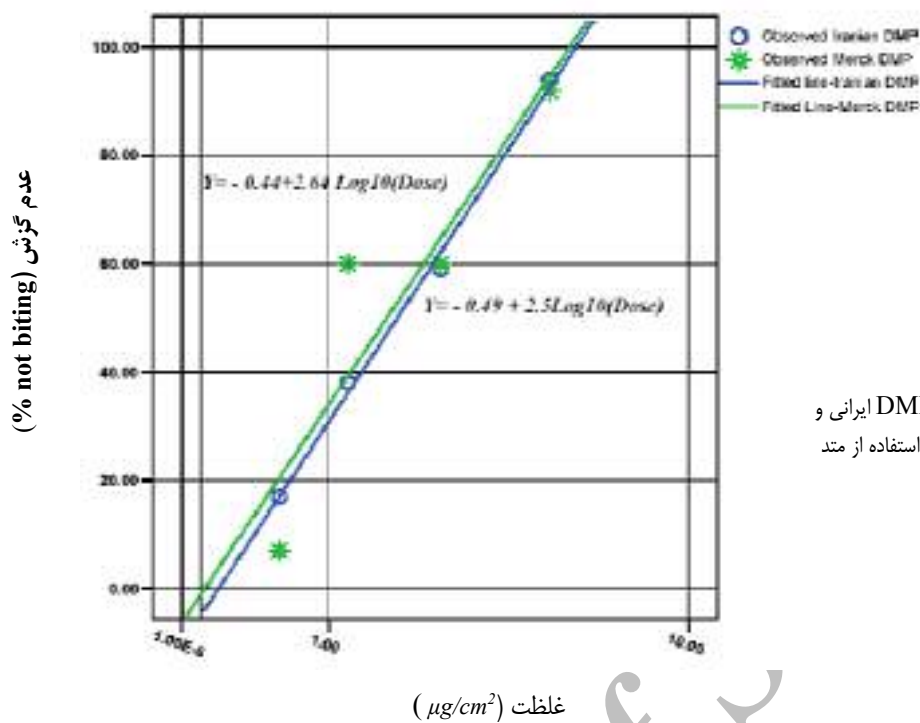
نمودار ۱: خط رگرسیون پروبیت ایرانی و خارجی در مقابل *An. stephensi* با استفاده از مدل اصلاح شده (با دوز منفرد).

غلظت ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

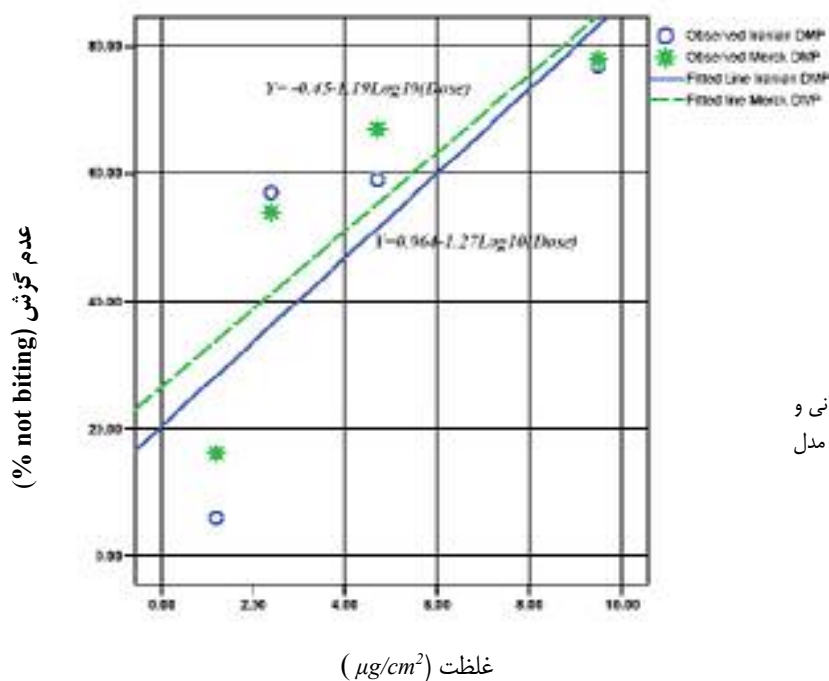


نمودار ۲: خط رگرسیون پروبیت ایرانی و خارجی در مقابل *An. stephensi* با استفاده از مدل استاندارد.

غلظت ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)



نمودار ۳: خط رگرسیون پروبیت ایرانی و خارجی در مقابل *Cx. pipiens* با استفاده از متد استاندارد.



نمودار ۴: خط رگرسیون پروبیت ایرانی و خارجی در مقابل *Cx. pipiens* با استفاده از مدل اصلاح شده (با دوز منفرد).

مورد مطالعه وجود ندارد ($p > 0.05$). تنها اشکالی که در روش اصلاح شده پیش می آید، افزایش دامنه و فاصله ED_{50} و ED_{95} می باشد (جدول ۳).

مقایسه دوز مؤثر (ED) دافع DMP/ایرانی با استفاده از متدهای استاندارد و اصلاح شده

نتایج حاصل از برآورد دوز مؤثر DMP ایرانی با استفاده از دو روش استاندارد و اصلاح شده در مقابل آنوفل استفسی نشان داد که اختلاف معنی داری در میزان برآورد ED_{50} و ED_{95} دو روش

جدول ۳: مقایسه میزان برآورد دوز مؤثر (ED) دافع DMP ایرانی بر حسب $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ در مقابل *An. stephensi* با استفاده از متدهای استاندارد و اصلاح شده

معادله خط	ED ₉₅ (CI 95%)	ED ₅₀ (CI 95%)	روش‌های تست
$y = -0.504x + 1.53x$	۲۵/۱۲(۷/۸۸-۳۶/۴۴)	۲/۱۳(۰/۰۵۸-۵/۰۶)	استاندارد ASTM
$y = 0.7881 + 1.58x$	۳۴/۵۴(۱۹/۲۶-۱۰۵/۷۵)	۳/۱۵(۱/۵۲-۵/۰۰)	اصلاح شده

بحث

آنوفل، *An. albimanus* حساسیت کمتری نسبت به دور کننده ها در مقایسه با سایر گونه‌ها دارد [۱۹; ۲۰].

علاوه بر تنوعی که در زمینه تکنیک‌های تست (استاندارد، اصلاح شده و ...) و نیز مدل‌های تست (سوژه انسانی، مدل حیوانی و غشای مصنوعی) وجود دارد، معمولاً از گونه‌های مختلف حشرات به ویژه پشه‌ها برای تست‌های آزمایشگاهی مواد دافع استفاده می‌گردد. به دلیل این که تأثیر دور کننده‌ها، دوز مؤثر (ED) و میزان دورکنندگی آنها بر روی گونه‌های مختلف پشه‌ها متفاوت است، نتایج به دست آمده از یک گونه قابل تعمیم و تسری (Extrapolating) به گونه‌های دیگر نمی‌باشد و برای بررسی و تعیین ویژگی‌های هر ماده دافع در مقابل یک گونه مشخص حتماً می‌بایست از همان گونه در مطالعات آزمایشگاهی استفاده نمود [۱۸]. برای مقایسه مواد دورکننده مختلف در آزمایشگاه می‌توان از گونه‌های متفاوت پشه‌ها استفاده نمود. البته می‌بایست دقت لازم به عمل آید و گونه‌های مناسب انتخاب شود، چرا که رفتار انواع پشه‌ها و به ویژه تمایل آنها برای گزش سوژه‌های انسانی و یا مدل حیوانی در شرایط آزمایشگاهی یکسان نیست. در این مورد لازم است از گونه‌هایی استفاده نمود که از نظر دانسیته یا فشار گزش (Biting Pressure) بر روی سوژه مطلوب باشند. در این مورد گونه‌های انسان دوست (Anthropophilic) همانند *Aedes aegypti* برای سوژه انسانی بسیار مناسب می‌باشد [۲۰]. زمانی که از مدل حیوانی برای تست ماده دافع استفاده می‌شود، بهتر است از گونه‌های حیوان دوست (Zoophilic) همانند برخی از آنوفل‌ها استفاده شود. البته سهولت پرورش و

مقایسه دوزهای مؤثر ED₅₀ و ED₉₅ در DMP ایرانی با DMP خارجی در مقابل آنوفل استفنسی و کولکس پی‌پینس نشان داد که اختلاف معنی داری در ماده مؤثره دو نوع دافع وجود ندارد. در نتیجه ماده مؤثره دی‌متیل فتالات سنتز شده در ایران توانایی رقابت و پتانسیل جایگزینی به جای ماده مؤثره دی‌متیل فتالات ساخت شرکت Merck را دارا می‌باشد. برطبق عقیده بوشر و همکاران، دوز مؤثر ED₅₀ شاخص مناسبی برای مقایسه مواد دافع با یکدیگر می‌باشد و دوز مؤثر ED₉₅ اغلب برای مقاصد کاربردی (practical) و تعیین درصد ماده مؤثره دافع در فرم تجاری به کار می‌رود [۱۷] به همین دلیل در این بخش نیز برای مقایسه انواع رپلانت از شاخص ED₅₀ استفاده شد. در مطالعه ما ED₅₀ ماده مؤثره DMP ایرانی و خارجی در مقابل آنوفل استفنسی به ترتیب $2/13 (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ و $1/91$ برآورد گردید. مطالعه مشابه دیگر نیز که از متد استاندارد استفاده کرده، ED₅₀ دافع DMP را در مقابل آنوفل استفنسی $1/90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ تعیین نموده است [۱۸]. به عبارت دیگر گونه‌های مورد مطالعه، فاقد هر گونه تحمل (Tolerance) نسبت به ماده دافع دی‌متیل فتالات هستند.

علاوه بر این مقایسه نتایج حاصل از برآورد ED₅₀ و ED₉₅ انواع مواد دورکننده در این بررسی نیز حساس بودن بیشتر کولکس پی‌پینس را در مقابل مواد دافع در مقایسه با آنوفل استفنسی نشان می‌دهد. نتایج تحقیقات مشابه نیز ثابت کرده است که برخی از گونه‌های کولکس همانند *Cx. pipiens* و نیز گونه‌هایی از آندس مثل *Aedes taeniorhynchus* در مقایسه با گونه‌های آنوفل نسبت به مواد دافع حساسیت بیشتری دارند و در میان پشه‌های

تجربیات بدست آمده در سایر مطالعات [۲۰] و در مطالعه حاضر نیز نشان داد که کولکس پی پینس گونه مناسب برای تست مواد دورکننده نبوده، دارای خطاهای ذاتی (Systemic error) در تست مواد دافع می باشد، لذا پیشنهاد می شود برای غربالگری و مطالعه مواد دورکننده در آزمایشگاه از پشه های آنوفل استفاده گردد.

مقایسه مدل های مختلف تست

پیش تر اشاره شد که متد استاندارد ASTM بر اساس کاربرد همزمان و تصادفی (راندوم) ۴ غلظت مختلف (Serial dilution) و یک حلال (شاهد) در یک تست می باشد و بر اساس ایده روش انتخاب آزاد (Free choice) بوشر [۱۷] طراحی شده است. در روش اصلاح شده که در برخی از مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است، مدل قفس تست همانند متد استاندارد است با این تفاوت که داخل cage به ۵ خانه مجزا و کاملاً جدا از هم تقسیم می شود. مقایسه نتایج حاصل از مطالعه ما نشان می دهد که با وجود اینکه اختلاف معنی داری در نتایج دوز مؤثر ED₅₀ و ED₉₅ دو مدل استاندارد ASTM و اصلاح شده وجود نداشت ولی دامنه دوز مؤثر (فاصله ED₅₀ و ED₉₅) در مدل اصلاح شده (با دوز منفرد) گسترده تر می شود. این وضعیت در مطالعات سایرین نیز قابل مشاهده است، به طوری که در مدل K&D که یک نوع مدل اصلاح شده می باشد نیز گسترده شدن دامنه دوز مؤثر (ED) و افزایش فاصله ED₅₀ و ED₉₅ مشاهده می شود. در یک مطالعه دیگر، دوز مؤثر سه نوع ماده دافع DEET، AI3-37220، و AI3-35765 در مقابل آنوفل استغفنیسی با استفاده از مدل اصلاح شده K&D برآورد گردیده است. براساس این مطالعه دوز مؤثر ED₅₀-ED₉₅ سه نوع رپلانت به ترتیب (μg/cm²) ۸/۴۴-۰/۱۳، ۰/۱۶-۸/۱۲ و ۰/۱۰-۳۰/۳۹ تعیین گردید [۲۱]. در مطالعه دیگری که این سه نوع دور کننده را در مقابل آنوفل استغفنیسی ولی با متد استاندارد ASTM بررسی نموده، نتایج حاصل از دوز مؤثر ED₅₀ و ED₉₅ آن به ترتیب (μg/cm²) ۳/۹۹-۰/۵۶، ۳/۹۰-۰/۲۷ و ۵/۵۳-۲/۶۳ برآورد گردیده است [۲۳]. مقایسه مطالعات فوق ضمن تأیید نتایج حاصل از مطالعه ما، نشان می دهد که دامنه

دست یابی به گونه ها نیز از عوامل مؤثر در انتخاب پشه ها محسوب می گردد.

در بسیاری از تست های مواد دورکننده با سوژه انسانی از آنوفل استغفنیسی استفاده می شود [۲۱]. در مطالعه حاضر که ارزشیابی مواد دورکننده بر روی سوژه انسانی انجام گرفت، از دو گونه آنوفل استغفنیسی و کولکس پی پینس استفاده شد. براساس نتایج به دست آمده در این بررسی نیز آنوفل استغفنیسی یک گونه بسیار مناسب برای تست ماده دافع در آزمایشگاه تشخیص داده شد، به طوری که پس از تحمل ۱۲ ساعت گرسنگی (Starvation) فشار گزش آن به طور متوسط ۲۶/۵ عدد گزش (Probe or Landing) در طول ۳۰ ثانیه تعیین گردید (SE= ±۳/۶۹). لازم به ذکر است که استاندارد فشار گزش پشه ها در آزمایشگاه حداقل ۱۰ گزش در ۳۰ ثانیه می باشد [۲۲].

پشه های کولکس به ویژه کولکس پی پینس یک گونه پرنده دوست (Ornithophilic) بوده، برای استفاده در تست های آزمایشگاهی مواد دورکننده مناسب نمی باشد و ممکن است نتایج نامنظم و غیره یکنواخت (Erratic) و یا حتی پاسخ های نامطمئن ارائه دهد (۲۰). در مطالعه ما نیز کار کردن با این گونه و استفاده از آن برای تست های آزمایشگاهی بسیار دشوار بود؛ به طوری که حتی پس از تحمل ۲۴-۱۲ ساعت گرسنگی هم تمایل چندانی به گزش از سوژه انسانی نشان نمی داد و میزان گزش آن (bp) کمتر از حداقل استاندارد لازم برای تست مواد دور کننده بود. به همین دلیل در بسیاری از موارد برای رسیدن به گزش مطلوب این گونه را به مدت ۴۸-۳۶ ساعت گرسنه نگه داشتیم تا فشار گزش به حد استاندارد برسد. در برخی موارد نیز در حین آزمایش بدون دلیل به یکباره فشار گزش آن افت پیدا می کرد. براساس مشاهدات نگارنده، تمایل این گونه آزمایشگاهی برای گزش از داوطلب انسانی در ساعات خارجی از شبانه روز مثلاً هنگام غروب، افزایش می یافت. با توجه به همین دلایل، در مطالعه حاضر مقایسه و غربالگری مواد دافع در بیشتر موارد با استفاده از آنوفل استغفنیسی صورت قرار گرفته است.

بنابراین فضای فعالیت هر پشه $7-14\text{cm}^3$ می‌باشد. کاهش فضای فعالیت پشه‌ها می‌تواند احتمال تماس آنها را با سطح پوست در معرض تست ($6/6\text{cm}^2$) افزایش دهد و در نتیجه علی‌رغم افزایش دوز دافع، گزش ممکن است همچنان وجود داشته باشد. این حالت باعث افزایش دوز مؤثر به ویژه ED_{95} خواهد شد که در مطالعه ما نیز این وضعیت همانند سایر مطالعات قابل مشاهده است.

علی‌رغم تمامی مباحث موجود، مطالعات آزمایشگاهی که عموماً برای تعیین دوزهای مؤثر ED_{50} و ED_{95} انواع مواد دورکننده صورت می‌گیرد، اغلب برای مقایسه و غربالگری (Screening) دورکننده‌های مختلف دارای اعتبار است و به همین دلیل، این غربالگری را هم با متد استاندارد و هم اصلاح‌شده می‌توان انجام داد؛ چرا که نسبت‌های دوز مؤثر در هر دو نوع متد حفظ می‌شود و تفاوت‌های نسبی دوز مؤثر انواع دورکننده‌ها با هر دو نوع متد قابل مشاهده است. البته مطالعات اصلی می‌بایست در فیلد و شرایط کاملاً طبیعی انجام پذیرد و ویژگی‌ها و معیارهای اصلی یک دورکننده در محیط تعیین گردد و مطالعات آزمایشگاهی (Cage studies) هیچ‌گاه نمی‌تواند جایگزین مطالعات صحرایی (Field studies) گردد [۲۲].

در نهایت مطالعه حاضر نشان داد که دی متیل فتالات سنتز شده در کشور ایران به عنوان یک ماده دورکننده دارای پتانسیل و ویژگی‌های لازم برای رقابت با مشابه خارجی می‌باشد. علاوه بر این متد ASTM جهت برآورد ED مناسب تر از مدل‌های اصلاح شده می‌باشد. همچنین در مطالعات آزمایشگاهی برای برآورد ED استفاده از *An. stephensi* بهتر از *Cx. pipiens* می‌باشد و خطای ذاتی کمتری ایجاد می‌نماید.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات بهداشت نظامی به انجام رسیده است. از مساعدت‌های این مرکز و سایر بخشهای دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله و همچنین کارکنان انسکتاریوم دانشگاه علوم پزشکی تهران قدردانی می‌نماییم. از داوطلبین

ED_{50} - ED_{95} در مدل اصلاح‌شده در مورد هر سه دورکننده گسترده‌تر از مدل استاندارد می‌باشد.

باید متذکر شد که یکی از ایرادهای عمده وارد شده به متد استاندارد ASTM این است که به لحاظ این که در این روش چند غلظت از یک ماده دافع به طور همزمان و در کنار هم و در یک تست مورد استفاده قرار می‌گیرد، احتمال تداخل اثر در بین غلظت‌های مختلف ماده دورکننده (Interaction treatment) وجود دارد. در مدل‌های اصلاح‌شده (مثل K&D) برای حذف این اثر، قفس‌های تست را قسمت‌بندی نموده‌اند که حذف کامل تداخل اثر بخارات دورکننده را سبب می‌گردد. ولی باید یادآوری نمود که بخش استانداردهای متد و مواد سازمان حفاظت محیط زیست (EPA-ASTM) هنوز مدل‌های اصلاح‌شده از قبیل مدل K&D را به عنوان یک روش استاندارد نپذیرفته است. براساس اتفاق نظر و بیانیه نشست سال ۲۰۰۰ این آژانس در شهر ویرجینیای آمریکا، در مدل‌های اصلاح‌شده نظیر K&D به دلیل قطع کامل ارتباط بین خانه‌های قفس تست با یکدیگر و با محیط بیرون (Enclose)، منفذی برای خروج بخارات ماده دافع که از سطوح آغشته پوست ناشی می‌شود، وجود نخواهد داشت، بنابراین فضای داخل خانه‌های قفس اشباع‌شده و باعث تشدید اثر دورکنندگی (Higher repellency) می‌گردد [۲۴] و این وضعیت باعث گسترده‌شدن دامنه دوز مؤثر خواهد شد. در مطالعه ما این وضعیت با شدت کمتر مشاهده شد، زیرا قفس ساخته شده از نوع اصلاح‌شده به طور کامل بی‌درو (Aerodynamic) نبود و تا حدودی منافذ لازم برای خروج بخارات ماده دورکننده را داشت. ایراد دیگر مدل اصلاح‌شده، کاهش فضای فعالیت و پرواز پشه‌ها در این مدل در مقایسه با مدل استاندارد ASTM می‌باشد. به طوری که در متد ASTM حجم فضای داخل قفس پلاستیکی 360cm^3 است که اگر ۱۵ پشه را برای تست انتخاب کنیم، فضای فعالیت هر پشه 24cm^3 خواهد بود. در صورتی که در مدل اصلاح‌شده که حجم داخل قفس به ۵ قسمت مساوی تقسیم می‌شود، فضای داخل هر خانه 72cm^3 خواهد بود که معمولاً در موقع تست تعداد ۱۰-۵ عدد پشه در داخل آن قرار می‌گیرد.

شرکت کننده در این مطالعه که بدون همکاری مجدانه ایشان این تحقیق به نتیجه مطلوب نمی‌رسید؛ صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع

- 1- Bernier UR, Furman KD, Kline DL, Allan SA, Barnard DR. Comparison of contact and spatial repellency of catnip oil and N,N-diethyl-3-ethylbenzamide (deet) against mosquitoes. *J Med Entomol* 2005; 42(3):306-311.
- 2- Costantini C, Badolo A, Ilboudo-Sanogo E. Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afrotropical vector mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98(11):644-652.
- 3- Roberts JR, Reigart JR. Does anything beat DEET? *Pediatr Ann* 2004; 33(7):443-453.
- 4- Debboun M, Wagman J. In vitro repellency of N,N-diethyl-3-methylbenzamide and N,N-diethylphenylacetamide analogs against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2004; 41(3):430-434.
- 5- Tuetun B, Choochote W, Kanjanapothi D, Rattanachanpichai E, Chaithong U, Chaiwong P et al. Repellent properties of celery, *Apium graveolens* L., compared with commercial repellents, against mosquitoes under laboratory and field conditions. *Trop Med Int Health* 2005; 10(11):1190-1198.
- 6- Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytother Res* 2005; 19(4):303-309.
- 7- Odalo JO, Omolo MO, Malebo H, Angira J, Njeru PM, Ndiege IO et al. Repellency of essential oils of some plants from the Kenyan coast against *Anopheles gambiae*. *Acta Trop* 2005; 95(3):210-218.
- 8- Pitasawat B, Choochote W, Tuetun B, Tipawangkosal P, Kanjanapothi D, Jitpakdi A et al. Repellency of aromatic turmeric *Curcuma aromatica* under laboratory and field conditions. *J Vector Ecol* 2003; 28(2):234-240.
- 9- Rajkumar S, Jebanesan A. Oviposition deterrent and skin repellent activities of *Solanum trilobatum* leaf extract against the malarial vector *Anopheles stephensi*. *J Insect Sci* 2005; 5:15.
- 10- Tawatsin A, Wratten SD, Scott RR, Thavara U, Techadamrongsin Y. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *J Vector Ecol* 2001; 26(1):76-82.
- 11- Das NG, Baruah I, Talukdar PK, Das SC. Evaluation of botanicals as repellents against mosquitoes. *J Vector Borne Dis* 2003; 40(1-2):49-53.
- 12- Kalyanasundaram M, Srinivasan R, Subramanian S, Panicker KN. Relative potency of DEPA as a repellent against the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Med Vet Entomol* 1994; 8(1):68-70.
- 13- Vartak PH, Tunqikar VB, Sharma RN. Comparative repellent properties of certain chemicals against mosquitoes, house flies and cockroaches using modified techniques. *J Commun Dis* 1994; 26(3): 156-30.
- 14- Travis BV, Morton FA. Treatment of clothing for protection against mosquitoes. *Proc New Jersey Mosq Exterm Assoc* 1946; 33rd:65-69.
- 15- Smith CN, Cole MM, Loys GW, Selhime A. Mosquito repellent mixtures. *J Econ Entomol* 1952; 45(5):805-809.
- 16- Schreck CE. Techniques for the evaluation of insect repellents: a critical review. *Annu Rev Entomol* 1977; 22:101-119.
- 17- Buescher MD, Rutledge LC, Wirtz RA, Glackin KB, Moussa MA. Laboratory tests of repellents against *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1982; 19(2):176-180.
- 18- Robert LL, Hallam JA, Seeley DC, Roberts LW, Wirtz RA. Comparative sensitivity of four *Anopheles* (Diptera: Culicidae) to five repellents. *J Med Entomol* 1991; 28(3):417-420.
- 19- Rutledge LC, Collister DM, Meixsell VE, Eisenberg GH. Comparative sensitivity of representative mosquitoes (Diptera: Culicidae) to repellents. *J Med Entomol* 1983; 20(5):506-510.
- 20- Barnard DR. Repellency of essential oils to mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1999; 36(5):625-629.
- 21- Klun JA, Debboun M. A new module for quantitative evaluation of repellent efficacy using human subjects. *J Med Entomol* 2000; 37(1):177-181.
- 22- Environmental protection Agency. EPA. Product performance test guidelines: OPPTS810. 3700, Insect repellents for human skin and outdoor premises. 1999; No: 712-C: 99-369.
- 23- Coleman RE, Richards AL, Magnon GJ, Maxwell CS, Debboun M, Klein TA et al. Laboratory and field trials of four repellents with *Culex*

pipiens (Diptera: Culicidae). J Med Entomol
1994; 31(1):17-22.
24- Environmental protection Agency. EPA. Insect
repellent product performance testing guideline

evaluation. FIFRA scientific Advisory Panel
Meeting, SAP report. 2000; No.00-02B: 44-56.

Archive of SID