تعیین شیوع و گونه پلاسمودیوم در پشه های ناقل شهرستان نیک شهر در جنوب استان سیستان و بلوچستان توسط روش Multiplex Nested-PCR

هادی میراحمدی[1]، انیس یزدیانی[2]، شیرزاد فلاحی[3]، نادیا کاظمی پور[4]*

۱- استادیار، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، انستیتو مقاومت سل، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۲- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران.

۳- دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۴ / زمستان ۹۷ / مسلسل ۷۸

چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۸/۱ پذیرش مقاله: ۹۷/۹/۱۲

مقدمه: مالاریا از جمله مهمترین بیماری های انگلی است که به عنوان یکی از مسایل مهم بهداشتی در کشورهای گرمسیر و نیمه گرمسیر مطرح می باشد. این مطالعه با هدف بررسی میزان و نوع آلودگی پشه های آنوفل ماده به انگل مالاریا با استفاده از روش مولکولی Multiplex Nested-PCR در جنوب استان سیستان و بلوچستان انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در نیمه دوم سال ۱۳۹۶ تعداد ۴۰۰ پشه آنوفل ماده توسط ایستگاه‌های چک حشره شناسی علوم پزشکی زاهدان از روستاهای شهرستان نیک شهر جمع آوری گردید. صید پشه ها با استفاده از روش های صید دستی از اماکن داخلی (انسانی و حیوانی) و اماکن خارجی طبیعی و مصنوعی (شلترپیت) انجام شد. پس از استخراج DNA، بررسی مولکولی با روش Multiplex Nested-PCR انجام گردید.

یافته‌ها: از ۳۱۰ نمونه جمع آوری شده از بخش‌های لاشار، اهوران و مرکزی شهرستان نیک شهر تعداد ۶ نمونه (۱/۵ ٪) آلوده به پلاسمودیوم ویواکس و از ۹۰ نمونه جمع آوری شده مربوط به بخش های فنوج و بنت شهرستان مذکور هیچ نمونه مثبتی گزارش نگردید. در این بررسی آلودگی به پلاسمودیوم فالسیپاروم و میکس (پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسی پاروم) مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان می دهد که در مکان های که در آن انتقال هر دو گونه پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسی پاروم رخ می دهد، تشخیص انگل‌های مالاریا به وسیله PCR می تواند یک مکمل بسیار مفید برای تایید تشخیص میکروسکوپی باشد.

واژه‌های کلیدی: مالاریا، استان سیستان و بلوچستان، Multiplex Nested-PCR، پشه های آنوفل.

*آدرس مکاتبه: کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.

پست الکترونیک: nadia_kazemi@yahoo.com

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

مقدمه

مالاریا یک بیماری عفونی در کشورهای در حال توسعه است که با لرز، تب و گاهی اوقات عوارض شدید و کشنده مشخص می گردد. این بیماری از نظر بهداشتی از اهمیت جهانی برخوردار بوده و یکی از شش بیماری مهم مطرح در برنامه های سازمان بهداشت جهانی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است (۱،۲). بر اساس آخرین گزارش منتشر شده از سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۶ میلادی، با وجود برنامه های مختلف کنترل و مبارزه با مالاریا، ۲۱۶ میلیون مورد ابتلا به مالاریا از ۹۱ کشور گزارش شده است که حدود ۵ میلیون مورد بیشتر از سال ۲۰۱۵ میلادی می باشد. میزان مرگ و میر بیماری حدود ۴۴۵۰۰۰ نفر در جهان بوده و در بین سال های ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ میلادی مرگ و میر بیماری مالاریا در مناطق جنوب شرق آسیا کاهش یافته ولی در مناطق آفریقا، حوزه ی مدیترانه شرقی و اقیانوس آرام افزایش یافته است (۲). از سوی دیگر، مالاریا به علت ایجاد کم خونی و عود های مکرر باعث اتلاف نیروی کار شده و ضررهای جبران ناپذیر اقتصادی و اجتماعی در سطح جهان به بار می آورد (۳). ایران یکی از کانون های شناخته شده مالاریا در منطقه مدیترانه شرقی است و مناطق اندمیک مالاریا در آن مربوط به سه استان سیستان و بلوچستان، هرمزگان و کرمان (شهرستان های جیرفت و کهنوج) می باشد (۴،۵). هدف نهایی برنامه حذف مالاریا در افق ۱۴۰۴ در ایران، قطع انتقال محلی این بیماری و تبدیل شدن به یک منطقه بدون مالاریا می باشد (۶،۷).

یکی از استراتژی های مهم در برنامه کنترل جهانی مالاریا ، کنترل پشه های آنوفل است که به عنوان یکی از بهترین و مؤثرترین روش ها برای ریشه کنی و کاهش انتقال مالاریا در نقاط مختلف جهان مورد بررسی قرار میگیرد. آگاهی از تنوع گونه های آنوفل و آلودگی به اسپروزواییت در غدد بزاقی آن ها یکی از شاخص های مهم اپیدمیولوژیک است که برای برنامه ریزی روش های کنترلی و پیشگیری مالاریا متناسب با شرایط محلی ضروری است (۸،۹).

روش های مختلف بیوشیمیایی، مولکولی و ایمنولوژیک (۱۲-۱۰) مانند؛ الکتروفورز ایزوآنزیم، واکنش زنجیره ی پلیمراز (PCR) و آنتی بادی مونوکلونال برای تشخیص پلاسمودیوم در پشه ها مورد استفاده قرار می گیرند (۱۳،۱۴). یکی از روش های مرسوم و متداول تعیین آلودگی در پشه های آنوفل به انگل مالاریا تشریح غدد بزاقی آنوفل های ماده صید شده با استفاده از استریومیکروسکوپ و میکروسکوپ نوری می باشد. روش مذکور بسیار پرزحمت و وقت گیر بوده و از حساسیت پایینی برخوردار است (۱۳،۱۵). روش های PCR دارای حساسیت بسیار بالا و کاملاً اختصاصی بوده و توانایی تشخیص ۱۰-۱ انگل در هر میکرولیتر خون را دارند که پنج برابر قدرت تشخیص میکروسکوپی گسترش های ضخیم رنگ آمیزی شده با گیمسا است. این روش علاوه بر تشخیص گونه انگل، توانایی تشخیص عفونت های توام را نیز دارد. روش PCR جهت تشخیص مالاریا در مناطق با انتقال پایین بسیار مناسب بوده و با استفاده از این روش می توان مقاومت دارویی را نیز مورد پایش قرار داد همچنین می‌توان بطور همزمان تعداد زیادی نمونه را مورد آزمایش قرارداد (۱۳).

در ایران به دلیل داشتن شرایط نسبتاً مساعد آب و هوایی و جغرافیایی در مناطق جنوب و جنوب شرقی و مجاورت با کشورهای افغانستان و پاکستان و همچنین مهاجرت بدون کنترل از این کشورها، مالاریا به عنوان یک مشکل بهداشتی عمومی حائز اهمیت می باشد. استان سیستان و بلوچستان دارای مرز طولانی با کشور پاکستان بوده و بیشترین موارد مالاریا را در کشور دارد (۱۶). این مطالعه با هدف اصلی بررسی میزان و نوع آلودگی پشه

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

های آنوفل ماده به اسپروزویت انگل مالاریا با استفاده از روش مولکولی Nested-PCR Multiplex در شهرستان نیک شهر استان سیستان و بلوچستان انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به صورت توصیفی مقطعی و در مناطق پرخطر انتقال بیماری مالاریا در شهرستان نیک شهر استان سیستان و بلوچستان، در نیمه دوم سال ۱۳۹۶ انجام گردید. آبادی های مورد بررسی در شهرستان عبارت بودند از بنت ، فنوج، لاشار ،اهوران و مرکزی که از روستاهای منتخب هر ۱۵روز یک بار نمونه گیری بعمل آمده و پشه های آنوفل خون خورده صید گردیدند. برای صید پشه های آنوفل از روش های صید دستی (Hand catch) در اماکن داخلی (انسانی و حیوانی) و از لوله های مکنده یا آسپیراتور در اماکن خارجی طبیعی و مصنوعی (Pit-shelter) استفاده شد. تمامی نمونه های صید شده با آسپیراتور با استفاده از یک پنبه کوچک آغشته به کلروفرم که روی لیوان های پلاستیکی قرار می گرفت کشته شدند. بلافاصله بعد از اتمام عملیات جمع آوری، نمونه های صید شده داخل لوله های حاوی الکل ۷۰ درصد قرار داده شده و به مرکز بهداشت مربوطه انتقال یافتند. با استفاده از لوپ حشره شناسی با بزرگ نمایی بالا آنوفل های خون خورده جداشده و به داخل تیوب های ۱/۵ میلی لیتری انتقال و مشخصات نمونه روی تیوب درج شد. به هر نمونه یک کد سه حرفی اختصاص داده شد. نمونه های داخل تیوب که عاری از هر گونه آلودگی بودند تا زمان استخراج DNA در فریزر ^{o}C ۲۰- قرار گرفتند.

تکنیک PCR

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA از خون و بافت روش ستونی تولید شرکت تکاپوزیست (DynaBio Blood/Tissue Genomic DNA Extraction Kit) انجام گرفت. تکنیک Multiplex Nested PCR برای تعیین گونه های پلاسمودیوم با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (جدول۱) انجام شد. در این مطالعه جهت واکنش PCR-۱ از یک جفت پرایمر الیگونوکلئوتیدی ۶rPLU و ۵rPLU استفاده شد. و در واکنش PCR-۲ از پرایمرهای rFAL.1، rFAL.2، rVIV.1، rVIV.2 جهت تعیین گونه پلاسمودیوم به صورت توام استفاده شد. محصول PCR اول توسط آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شده و به عنوان الگو در PCR دوم استفاده گردید.

مراحل PCR به شرح زیر می باشد: جداسازی مولکول DNA در حرارت ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، حرارت ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (۲۵ سیکل برای مرحله اول و ۳۰ سیکل برای Nested)، شروع ساخت مولکولهای جدید DNA در ۵۸ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه برای مرحله اول و ۳۰ ثانیه برای Nested، اتمام گسترش کپی سازی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای مرحله اول و ۵ دقیقه برای Nested. و در نهایت اتمام واکنش و کاهش دما به ۲۰ درجه (۱۴،۱۷). پس از اتمام واکنش PCR، جهت ارزیابی تکثیر قطعه مورد نظر از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ استفاده گردید (۱۸،۱۹).

یافته‌ها

در مجموع ۴۰۰ پشه آنوفل ماده گونه کولی سیفاسیس صید گردید. از ۳۱۰ نمونه جمع آوری شده از بخش های لاشار، اهوران و مرکزی شهرستان نیک شهر تعداد ۶ نمونه (۱/۵ ٪) آلوده به پلاسمودیوم ویواکس و از ۹۰ نمونه جمع آوری شده مربوط به بخش های فنوج و بنت شهرستان مذکور هیچ نمونه مثبتی گزارش نگردید.

در این بررسی آلودگی به پلاسمودیوم فالسیپاروم و میکس (پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسی پاروم) مشاهده نشد. در مجموع ۱/۶۶ ٪ از آنوفل های کولی سیفاسیس بررسی شده آلوده به انگل پلاسمودیوم بودند.

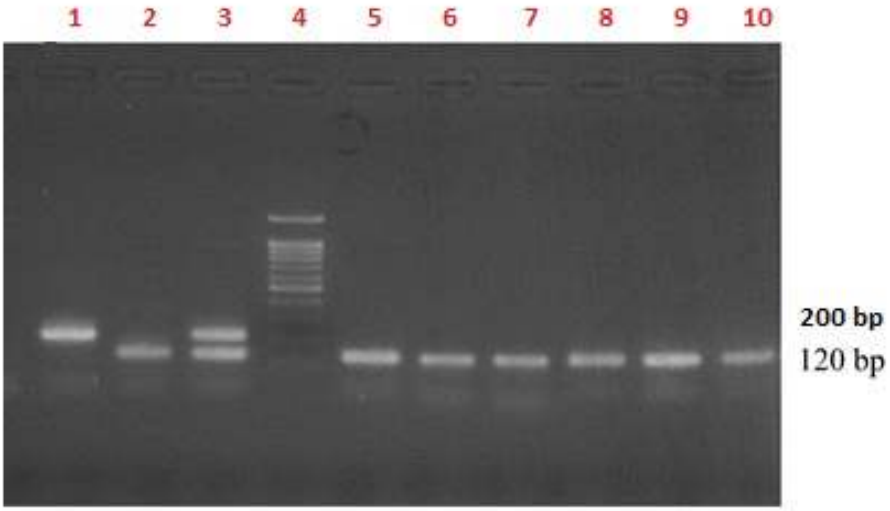
Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

جدول ۱. پرایمرها برای Multiplex Nested- PCR جهت تعیین گونه پلاسمودیوم

نام پرایمر	توالی	طول محصول	رفرنس
rplu5	5'-CTTGTTGTTGCCTTAAACTT-3'	1200bp	۱۴
rplu6	5'-TTAAAATTGCAGTTAAAACG-3'		
rFAL.1	5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3'	205bp	۱۴
rFAL.2	5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'		
rVIV.1	5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3'	120bp	۱۴
rVIV.2	5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'		

جدول ۲. نتایج پراکنش آلودگی به پلاسمودیوم در پشه های آنوفل شهرستان نیک شهر

بخشهای شهرستان نیک شهر		گونه پلاسمودیوم شناسایی شده به روش Nested-PCR			تعداد کل
		پلاسمودیوم ویواکس	پلاسمودیوم فالسیپاروم	منفی	
بنت	تعداد	۰	۰	۳۰	۳۰
	درصد	۰	۰	۱۰۰٪	۱۰۰٪
فنوج	تعداد	۰	۰	۴۲	۴۲
	درصد	۰	۰	۱۰۰٪	۱۰۰٪
لاشار	تعداد	۱	۰	۸۹	۹۰
	درصد	۱/۱	۰	۹۸/۹٪	۱۰۰٪
اهوران	تعداد	۲	۰	۹۴	۹۶
	درصد	۲/۰۸	۰	۹۷/۰۲	۱۰۰٪
مرکزی	تعداد	۳	۰	۱۲۱	۱۲۴
	درصد	۲/۴۲	۰	۹۷/۵۸	۱۰۰٪



شکل ۱. نمایش محصول PCR بر روی ژل آگارز برای حضور انگل پلاسمودیوم .

لاین ۱ و ۲ و ۳ کنترل مثبت، لاین های ۱۰-۵ پلاسمودیوم ویواکس(bp ۱۲۰)، لاین ۴ مارکر۱۰۰bp

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری مالاریا هنوز به عنوان مهمترین مشکل بهداشتی ناحیه جنوب شرقی ایران به ویژه در استان سیستان و بلوچستان مطرح بوده و نقش مهمی را در شرایط اقتصادی و اجتماعی این منطقه محروم ایفا می نماید. در مطالعه حاضر جهت تعیین شیوع و تشخیص گونه پلاسمودیوم در پشه های آنوفل ناقل از روش مولکولی Multiplex Nested-PCR استفاده گردید. این روش دارای حساسیت بسیار بالایی بوده و علاوه بر تشخیص جنس و گونه انگل، توانایی تشخیص عفونت های میکس را نیز دارد (۲۰). نتایج مطالعه کنونی نشان داد که گونه ی غالب پشه آنوفل در شهرستان نیک شهر استان

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

سیستان و بلوچستان آنوفل کولی سیفاسیس (۸۳/۳۳ ٪) می باشد (جدول۲). گونه مالاریای غالب در ایران ویواکس است (۲۱) و آلوده بودن ۱/۵ ٪ پشه ها در شهرستان نیک شهر این مسئله را تایید می کند که این یافته با نتایج حاصل از سایر مطالعات نیز مطابقت دارد. در مطالعه ای مشابه که توسط عشاقی و همکاران ، در شهرستان های چابهار و ایرانشهر انجام گردید گونه ی غالب در این شهرستانها نیز ویواکس بود (۲۲). همچنین آسمار و همکاران، مطالعه ایی در مناطق اندمیک ایران با استفاده از روش PCR انجام دادند. نتایج این مطالعه حاکی از آن بود که پلاسمودیوم ویواکس انگل غالب در منطقه می باشد (۲۳). گوو یو و همکاران، مطالعه ای در مرز چین و میانمار با استفاده از روش Nested-PCR انجام دادند که نتایج نشان داد پلاسمودیوم ویواکس انگل غالب در منطقه‌ی مورد مطالعه می باشد (۲۴). در مطالعه صورت گرفته توسط کیو سیک چانگ و همکاران در کره‌ی جنوبی، ۵/۷ ٪ پشه های آنوفل کلینی با روش PCR آلوده به پلاسمودیوم ویواکس بودند (۲۵).

در مطالعه کلانتری و همکاران ، که در شهرستانهای ممسنی و رستم استان فارس صورت گرفت ۵۱۲ پشه آنوفل ماده به روش PCR تعیین گونه شدند. نتایج مطالعه نشان داد گونه ی غالب در مناطق ذکر شده آنوفل دتالی (۷۱/۳۸ ٪) بوده و هیچ آلودگی به انگل پلاسمودیوم با روش PCR در پشه ها گزارش نگردید. در حالی که در مطالعه حاضر ۱/۶۶٪ از پشه های آنوفل مورد مطالعه به پلاسمودیوم آلوده بودند. استان سیستان و بلوچستان جزء مناطق اندمیک مالاریا محسوب می شود و تفاوت اندمیسیته این استان با استان فارس باعث شده که آلودگی به پلاسمودیوم در آنوفل های این منطقه گزارش شود (۲۶).

در مطالعه‌ایی مشابه در هند ماهاپاترا و همکاران جهت بررسی آلودگی پشه‌های آنوفل به پلاسمودیوم ۵۲۳ پشه آنوفل را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که گونه‌ی غالب آنوفل آنولاریس می باشد، که پس از جداسازی غدد بزاقی و بررسی میکروسکوپی آنها هیچ اسپوروزواییتی مشاهده نگردید. در حالیکه با روش PCR، ۷ پشه آنوفل آنولاریس (۳/۴ ٪) آلوده به پلاسمودیوم فالسی پاروم بودند (۲۷). نتایج مطالعه دیگری که توسط نپومیچن و همکاران، در ماداگاسکار انجام شد نشان داد (۹/۵ ٪) آنوفل‌های کاستانی آلوده به پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسی پاروم می باشند (۲۸). گونزالس و همکاران، مطالعه ای در شمال کلمبیا با استفاده از روش Nested-PCR انجام دادند که گونه‌ی غالب آنوفل‌های آلبیمانوس ۸۳ ٪ و آلوده به هر دو نوع پلاسمودیوم فالسی پاروم و ویواکس بودند (۲۹). آشوانی کومار و همکاران در مطالعه ای در غرب هند، با استفاده از روش Nested-PCR آلودگی در آنوفل‌ها را بررسی کردند نتایج آنان نشان داد که ۲/۸ ٪ آنوفل های ساب پیکتوس آلوده به پلاسمودیوم فالسی پاروم و ویواکس بودند وآلودگی به صورت میکس نیز مشاهده گردید (۳۰).

نتایج چهار مطالعه فوق با مطالعه حاضر از نظر شیوع گونه های پلاسمودیوم متفاوت می باشد. شیوع گونه های مختلف پلاسمودیوم در مناطق مختلف جهان تحت تأثیر عوامل بسیاری قرار دارد که تفاوت آب و هوا و شرایط اکولوژیکی می‌تواند بر روی این مسئله بسیار مؤثر باشد.

آگاهی از ترکیب گونه های آنوفل و میزان اسپوروزوایت در غدد بزاقی آنها به کمک روش‌های مطمئن و حساس جهت برنامه ریزی و پیشگیری بیماری مالاریا امری حیاتی و اجتناب ناپذیر می باشد (۹). این مطالعه نشان داد که روش Multiplex-Nested PCR را می توان به سهولت برای تعداد زیادی نمونه استفاده نمود. در این روش نیازی به تشریح غدد بزاقی آنوفل نیست و حتی نمونه های خشک شده و قدیمی را می توان مورد بررسی قرار داد. بنابراین نیاز به تجهیز آزمایشگاه‌ها و اعزام

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

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

ورود مهاجرین افغانی و پاکستانی جویای کار به شهرستان نیک شهر استان سیستان و بلوچستان و رفت و آمدشان به کشور مبدأ در حالی انجام می گیرد که افغانستان و پاکستان به عنوان پرخطرترین کشورهای انتقال مالاریا شناخته شده اند (۳۱،۲۱،۲). در مطالعه ای نجاتی و همکاران در شهرستان کنارک، تغییرات کانونی مالاریا و افزایش موارد بیماری در سال ۱۳۸۷ را به حضور اتباع بیگانه نسبت دادند (۳۲). رئیسی و همکارانش در مطالعه ای بیشترین موارد غیر ایرانی را مربوط به شهرهای هم جوار ایالت بلوچستان پاکستان در استان سیستان و بلوچستان دانستند (۳۳). پودات و همکاران نیز به فاکتورهای موثر بر کاهش موارد مالاریا در شهر بندرعباس پرداخته و به این نتیجه رسیدند که این شهر به دلیل مهاجرپذیر بودن و رفت و آمد اتباع بیگانه همواره در معرض خطر اپیدمی های مالاریا می باشد (۳۴). لذا می توان به اهمیت مهاجرت به عنوان بحران و چالشی مهم در امر کنترل مالاریا اشاره کرد.

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که مالاریای ایران برخلاف مالاریای آفریقا و کشورهای دیگر تابع شرایط اقلیمی بوده و نزدیک به ریشه کنی می باشد (۳۷-۳۵). بدین معنی که این وضعیت ناپایدار ممکن است در ایجاد نگرانی موثر باشد که افزایش بارندگی در مناطق پرخطر با احتمال شیوع بیشتر بیماری همراه باشد (۳۸). در استان سیستان و بلوچستان علاوه بر شرایط اقلیمی، عوامل اجتماعی، اقتصادی و فرهنگی، کمیت و کیفیت سال به سال اجرای برنامه های کنترل مالاریا، موقعیت مرزی و همسایگی با کشورهای افغانستان و پاکستان و مباحث مربوط به مهاجران افغانی و پاکستانی نیز در بروز سالیانه ی این بیماری نقش مهمی دارند (۳۱).

با توجه به اینکه استان سیستان و بلوچستان در مرحله حذف مالاریا قرار دارد، یکی از بهترین و موثرترین روش‌ها جهت پایش برنامه فوق، پایش آلودگی در پشه‌های آنوفل ماده می باشد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات قبلی نشان داد که آلودگی پشه های ناقل مالاریا در شهرستان نیک شهر سیر صعودی داشته و به نظر می رسد برنامه حذف مالاریا در منطقه تا سال ۱۴۰۴ نیاز به مطالعات، بررسی و تمهیدات بیشتری دارد.

این نتایج نشان می دهد که در مکان هایی که در آن انتقال هر دو گونه ویواکس و فالسی پاروم رخ می دهد، تشخیص انگلهای مالاریا با روش PCR می‌تواند یک مکمل بسیار مفید برای تشخیص میکروسکوپی باشد. بنابراین می‌توان مطالعات اپیدمیولوژیک مولکولی طی هر سال انجام داد. با توجه به اینکه استان سیستان و بلوچستان در مرحله حذف مالاریا قرار دارد هرگونه سهل انگاری در زمینه کنترل این بیماری می تواند به اپیدمی این بیماری منجر شود. لازم است اقدامات کنترلی به طور مداوم و گسترده در تمامی مناطق کشور اعمال شده و تمام مبادی ورودی کشور کنترل شده و از ورود بی رویه مهاجرین جلوگیری بعمل آید.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل اجرای بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد سرکار خانم انیس یزدیانی بوده و بدین وسیله از همکاری سخاوتمندانه دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و پرسنل آن برای حمایت لجستیک خود در جمع‌آوری نمونه و تشخیص مالاریا در پشه‌های ناقل قدردانی می‌گردد.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

References

1. D'Acremont V, Bosman A. WHO informal consultation on fever management in peripheral health care settings: a global review of evidence and practice. Geneva: World Health Organization. 2013:759-764.
2. Organization WH. World malaria report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO [cited 2017 Jun 13].
3. Reiter P. Global warming and malaria: knowing the horse before hitching the cart. Malaria Journal. 2008;7(1):S3.
4. Beljaev A. The malaria situation in the WHO eastern Mediterranean region. Meditsinskaia parazitologiia i parazitarnye bolezni. 2000(2):12-15.
5. Soleimani-Ahmadi M, Vatandoost H, Zare M, Turki H, Alizadeh A. Topographical distribution of anopheline mosquitoes in an area under elimination programme in the south of Iran. Malaria journal. 2015;14(1):262 (In Persian).
6. Soleimani-Ahmadi M, Vatandoost H, Shaeghi M, Raeisi A, Abedi F, Eshraghian M, et al. Field evaluation of permethrin long-lasting insecticide treated nets (Olyset®) for malaria control in an endemic area, southeast of Iran. Acta tropica. 2012;123(3):146-153(In Persian).
7. Elimination M. In Islamic Republic of Iran (Horizon 1404). Ministry of Health and Medical Education.
8. Raghavendra K, Barik TK, Reddy BN, Sharma P, Dash AP. Malaria vector control: from past to future. Parasitology research. 2011;108(4):757-779.
9. Soltani A, Vatandoost H, Jabbari H, Mesdaghinia A, Mahvi A, Younesian M, et al. Field efficacy of expanded polystyrene and shredded waste polystyrene beads for mosquito control in artificial pools and field trials, Islamic Republic of Iran. 2012 (In Persian).
10. Mirahmadi H, Fallahi Sh, Taghipour N, Turki H, Seyyed Tabaei SJ. Cloning and Sequence Analysis of Recombinant Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 (PvMSP-142 kDa) In pTZ57R/T Vector. Iranian journal of parasitology. 2015;10(2):197-205 (In Persian).
11. Mirahmadi H, Fallahi Sh, Omrani VF, Kazemi B, Haghighi A, Tabaei SJ. High-Level Expression of Immunogenic Recombinant Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein (Pvmsp-142 kDa) in pGEX 6P1 Vector. Iranian journal of public health. 2015;44(1):89 (In Persian).
12. Mirahmadi H, Fallahi Sh, Seyyed Tabaei SJ. Soluble recombinant merozoite surface antigen-142kDa of Plasmodiumvivax: Animproveddiagnostic antigen for vivax malaria. Journal of microbiological methods. 2016;123:44-50 (In Persian).
13. Mohammadzadeh T, Hatam G, Kalantari M, Sarkari B, Motazedian MH, Sadjjadi SM, et al. Molecular and microscopic-based characterization of Plasmodium spp. in fars and Hormozgan Provinces, South of Iran. Journal of tropical medicine. 2014;2014 (In Persian).
14. Pinheirob VE, Thaithongc S, Browna KN. High sensitivity of detection of human

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Molecular and biochemical parasitology. 1993;61:315-320.

15. Arez A, Lopes D, Pinto J, Franco A, Snounou G, Do Rosário V. Plasmodium sp.: optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (Anopheles sp.) samples. Experimental parasitology. 2000;94(4):269-272.
16. Halimi M, Delavari M. Jafarymadrak. M. Modeling the spatial spread of malaria in Baluchistan province geographically weighted regression model. Journal of spatial planning. 2013;17(3):85-107 (In Persian).
17. Fuehrer H-P, Noedl H. Recent advances in detection of Plasmodium ovale: implications of separation into the two species Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium ovale curtisi. Journal of clinical microbiology. 2014;52(2):387-391.
18. Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A, Djadid ND. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. Malaria journal. 2002;1(1):2 (In Persian).
19. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed Plasmodium falciparum and P. vivax infections undetected by conventional microscopy. Transactions of the Royal society of tropical medicine and hygiene. 1992;86(6):609-612.
20. Nankabirwa JI, Yeka A, Arinaitwe E, Kigozi R, Drakeley C, Kamya MR, et al. Estimating malaria parasite prevalence from community surveys in Uganda: a comparison of microscopy, rapid diagnostic tests and polymerase chain reaction. Malaria journal. 2015;14(1):528.
21. Manouchehri A, Zaim M, Emadi A. A review of malaria in Iran, 1975-90. Journal of the American mosquito control association. 1992;8(4):381-385 (In Persian).
22. Oshaghi M, Moradi M, Taghilou B. specific detection of MALARIA parasites using nested-PCR in individual mosquitoes and infected bloods in CHabahar and Iranshahr, Iran. 2004 (In Persian).
23. Assmar M, Ter Hovanessian A, Naddaf S, Piazak N, Masomi H. PCR Detection of malaria parasites in Anopheles stephensi and Anopheles culicifacies mosquitoes collected from southern endemic foci of Iran. Journal of school of public health and institute of public health research. 2005;3(3):19-26.
24. Yu G, Yan G, Zhang N, Zhong D, Wang Y, He Z, et al. The Anopheles community and the role of Anopheles minimus on malaria transmission on the China-Myanmar border. Parasites & vectors. 2013;6(1):264.
25. Chang KS, Yoo D-H, Ju YR, Lee WG, Roh JY, Kim H-C, et al. Distribution of malaria vectors and incidence of vivax malaria at Korean army installations near the demilitarized zone, Republic of Korea. Malaria journal. 2016;15(1):259.
26. Kalantari M, Soltani Z, Ebrahimi M, Yousefi M, Amin M, Shafiei A, et al. Monitoring of Plasmodium infection in humans and potential vectors of malaria in a newly emerged focus in southern Iran. Pathogens

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

and global health. 2017;111(1):49-55 (In Persian).

27. Mahapatra N, Marai N, Ranjit M, Parida S, Hansdah D, Hazra R, et al. Detection of Plasmodium falciparum infection in anopheles mosquitoes from Keonjhar district, Orissa, India. Journal of vector borne diseases. 2006;43(4):191.
28. Nepomichene TN, Tata E, Boyer S. Malaria case in Madagascar, probable implication of a new vector, Anopheles coustani. Malaria journal. 2015;14(1):475.
29. González C, Molina AG, León C, Salcedo N, Rondón S, Paz A, et al. Entomological characterization of malaria in northern Colombia through vector and parasite species identification, and analyses of spatial distribution and infection rates. Malaria journal. 2017;16(1):431.
30. Kumar A, Hosmani R, Jadhav S, Sousa T, Mohanty A, Naik M, et al. Anopheles subpictus carry human malaria parasites in an urban area of Western India and may facilitate perennial malaria transmission. Malaria journal. 2016;15(1):124.
31. Sartipi M, Khosravi A, Khalaji K, Shamsipour M, Kazemi GMH, Sakeni M, et al. Examining the risk factors of MALARIA: a matched case –control study. 2014 (In Persian).
32. Raiesi A, Nejati J, Ansari-moghaddam A, Sakeni M, Faraji L, Paktinat B, et al. Effects of foreign immigrants on malaria situation in cleared up and potential foci in one of the highest malaria burden district of southern Iran. Malaria journal. 2012;11(1):P81 (In Persian).
33. Raeisi A, Nikpoor F, Ranjbar Kahkha M, Faraji L. The trend of Malaria in IR Iran from 2002 to 2007. Hakim research journal. 2009;12(1):35-41 (In Persian).
34. Poudat A, Ladoni H, Raeisi A. Possible factors affecting the malaria situation in the city of Bandar Abbas in 1999-2002. Journal of Hormozgan University of Medical Sciences. 2006;2:101-110. (In Persian)
35. Mirahmadi H, Shahrakipour A, Mehravaran A, Khorashad AS, Rahmati-Balaghaleh M, Zarean M. Evaluation of malaria multiplex/nested PCR performance at low parasite densities and mixed infection in Iran: A country close to malaria elimination. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2018;65:283-287 (In Persian).
36. Rahmati Balaghaleh MZM, Afzal Aghaee M, Shamsian SA, Mirahmadi H, Arya A. Comparison of PfHRP-2/pLDH RDTs with Light Microscopy in a Low Prevalence Setting in Southeastern Iran, Sistan and Baluchestan: Due to Implementation of Malaria Elimination Program. International Journal of Infection 2018;5(1):e12286 (In Persian).
37. Ebrahimzadeh A NDS, Mirahmadi H, Mehravaran A, Salimi Khorashad A, Turki H. The Incidence of Current Infection with Different Human Malaria Species by Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Suspicious Malaria Patients on Elimination Region Sistan and Baluchistan Province, Southeast of Iran. Jundishapur

Journal of microbiology. 2017;10(10): e58254 (In Persian).

38. Soleimani Fard SD, Akbari M, Sabet Ghadam M, Saberi S. Malaria situation in Isfahan in the last five years. Journal of Isfahan Medical School, 2012;29(132): 173-280 (In Persian).

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

Determination of the prevalence and type of *plasmodium* in mosquitoes present in the city of Nik Shahr, Southern Sistan and Baluchestan Province, IR Iran, by Multiplex Nested-PCR

Mirahmadi M[1], Yazdani A[2], Fallahi Sh[3], Kazemipour N[4 *]

1.Assistant Professor, Infectious Disease and Tropical Medicine Research Center, Tuberculosis Resistance Institute, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

2.Graduate Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Kerman, Kerman, Iran.

3.Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

4.Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Kerman, Kerman, Iran, nadia_kazemi@yahoo.com.

Received: *23 Oct 2018* **Accepted:** *3 Dec 2018*

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 1:11 +0430 on Tuesday May 21st 2019

Abstract

***Background*:** Malaria is one of the most important parasitic diseases, and is considered one of the important health issues in tropical and subtropical countries. The aim of this study was to determine the rate and type of infection of Anopheles mosquitoes by malarial parasites using Multiplex Nested-PCR in the South of Sistan and Baluchestan province.

Materials and Methods: In the second half of 2017, 400 Anopheles mosquitoes were collected from Zahedan Medical Insecticide Check Centers located in villages around Nikshahr city. The mosquitoes were caught by hand-held methods in domestic (human and animal), natural and artificial outdoor places (Shelterpit). After DNA extraction, molecular analysis was performed using Multiplex Nested-PCR.

Results: Of the 310 samples collected from parts of Lashar, Ahuran and the centre of Nik Shahr city, 6 samples (1.5%) were found to be infected with Plasmodium vivacs, and 90 samples collected from the Fennoj and Bennett sections of the city had no infection. Samples containing plasmodium falciparum and a mixture of Plasmodium vivacs and Plasmodium falciparum were not detected in this study.

Conclusion: The results show that in places where the transmission of both species of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum occur, the detection of malarial parasites by PCR can be a very useful complement to confirm microscopic diagnosis.

Keywords: Malaria, Sistan and Baluchestan province, Multiplex Nested-PCR, Anopheles mosquitoes

****Citation:*** Mirahmadi M, Yazdani A, Fallahi Sh, Kazemipour N. Determination of the prevalence and type of plasmodium in the mosquitoes of the city of Nickshahr in Southern Sistan and Baluchestan province by Multiplex Nested-PCR. Yafte. 2019; 20(4):63-73.