

Research Article

Development of an Experimental Infection Model of Anopheles Stephensi with Plasmodium Berghei and Molecular Detection of Sporozoites using qPCR

Zeinab Mohammadi Firouz^{#1} , Zahra Sadat Mousavi Shafi^{#2} , Flora Forouzesh³ , Akram Abouie Mehrizi⁴ , Jafar Joorbandi Sani⁵ , Hemn Yousefi⁶ , Sakineh Pirahmadi^{7*} 

1. Department of Genetics, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran; Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2. Department of Genetics, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran; Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3. Department of Genetics, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

4. Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

5. Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

6. Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

7. Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Article history:

Received: February 22, 2025

Revised: April 13, 2026

Accepted: July 18, 2026

e-Published: September 06, 2026



***Corresponding author:** Sakineh Pirahmadi, Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

E-mail: s.pirahmadi2020@gmail.com

#Co-First authors: Zeinab Mohammadi Firouz and Zahra Sadat Mousavi contributed equally to this work and share first authorship

Abstract

Background and Aim: Malaria is a prevalent infectious disease caused by parasites of the genus Plasmodium and transmitted to vertebrate hosts by Anopheles vectors. This study focuses on developing an experimental model using Plasmodium berghei, BALB/c mice, and Anopheles stephensi, emphasizing the application of qPCR for sensitive detection of Plasmodium berghei sporozoite infection in Anopheles stephensi.

Materials and Methods: Female BALB/c mice infected with Plasmodium berghei were used to feed Anopheles stephensi. Subsequently, the mosquitoes were kept for 24 days at 19-21°C and 60%-80% relative humidity. Microscopic evaluation of mosquito salivary glands for sporozoites was conducted. To confirm infection, a qPCR assay targeting the Plasmodium berghei cytb gene was conducted. Finally, to assess the infectivity of sporozoites for the second host, the infected mosquitoes were used for blood feeding of BALB/c mice on day 21 after blood feeding.

Results: qPCR analysis confirmed sporozoites in 100% of the infected mosquitoes, with a mean Cq value of 18.84 ± 2.33 . Standard curve analysis of the positive control sample showed an R value of 0.98 and a slope of -3.38, with a Cq detection limit of 34 cycles. Additionally, the blood smears of mice after 5 days of mosquito blood feeding showed that all of the mice were infected with Plasmodium berghei, indicating 100% infectivity of sporozoites.

Conclusion: This study developed a qPCR analysis with specific amplification of the P. berghei cytb gene, demonstrating higher sensitivity compared to microscopic examination. The qPCR results showed a high infection frequency in the mosquitoes. This model can be instrumental in future research on transmission-blocking strategies or parasite-Anopheles interactions.

Keywords: Anopheles stephensi, Malaria, Plasmodium berghei, qPCR test, Sporozoite

Please cite this article as follows: Mohammadi Firouz Z, Sadat Mousavi Shafi Z, Forouzesh F, Abouie Mehrizi A, Joorbandi Sani J, Yousefi H, Pirahmadi S. Development of an Experimental Infection Model of Anopheles Stephensi with Plasmodium Berghei and Molecular Detection of Sporozoites using qPCR. SJKUMS. 2026;31(3):239-246. DOI: 10.22034/31.3.239

توسعه یک مدل آزمایشگاهی آلودگی پشه آنوفل استغفنی به پلاسمودیوم برگئی و شناسایی مولکولی اسپوروزوئیت‌ها با استفاده از qPCR

زینب محمدی فیروز^۱ ID، زهرا سادات موسوی شفیعی^۲ ID، فلورا فروزش^۳ ID، اکرم ابوئی مهریزی^۴ ID، جعفر جوربندی ثانی^۵ ID، هیمن یوسفی^۶ ID، سکینه پیراحمدی^۷ ID*

۱. گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲. گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳. گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۵. بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۶. بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۷. بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: مالاریا نوعی بیماری عفونی شایع است که براه ابتلا به پاتوژنی به نام پلاسمودیوم ایجاد می‌شود که با گزش پشه آنوفل ماده به میزبان ماهرار منتقل می‌شود. هدف این مطالعه توسعه مدل آزمایشگاهی پلاسمودیوم برگئی - موش بلب سی-آنوفل استغفنی با تأکید بر کاربرد روش حساس qPCR برای تشخیص عفونت اسپوروزوئیت‌های پلاسمودیوم برگئی در آنوفل استغفنی است.

مواد و روش‌ها: موش بلب سی ماده آلوده به پلاسمودیوم برگئی برای خون‌خواری پشه‌های آنوفل استغفنی استفاده شد. سپس، پشه‌ها به مدت ۲۴ روز در دمای ۱۹ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ تا ۸۰ درصد نگهداری شدند. به منظور بررسی حضور اسپوروزوئیت‌ها، غدد بزاقی پشه‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. به منظور تأیید آلودگی، تست qPCR با تکثیر اختصاصی ژن cytochrome b (cytb) انگل پلاسمودیوم برگئی انجام شد. در نهایت، برای بررسی قابلیت اسپوروزوئیت‌ها در آلودگی میزبان بعدی، در روز ۲۱ بعد از خون‌خواری پشه‌های آلوده برای خون‌خواری موش بلب سی استفاده شدند.

یافته‌ها: در بررسی آلودگی غدد بزاقی پشه‌های بررسی‌شده با روش qPCR، اسپوروزوئیت‌ها در تمامی پشه‌ها موجود بودند که میانگین عدد Cq در تست qPCR 18.84 ± 2.33 بود. نتایج آنالیز منحنی استاندارد روی نمونه کنترل مثبت عدد R2 برابر با ۰/۹۸ و شیب خط برابر با ۳/۳۸- را نشان داد و Cq حد تشخیص ۳۴ به دست آمد. به علاوه، نتایج بررسی اسمیر موش‌ها در روز ۵ بعد از خون‌خواری نشان داد تمامی موش‌هایی که برای گزش پشه‌های آلوده استفاده شدند، به انگل پلاسمودیوم برگئی آلوده بودند (قابلیت آلودگی ۱۰۰ درصد اسپوروزوئیت‌ها).

نتیجه‌گیری: در این مطالعه برای تأیید آلودگی اسپوروزوئیتی در پشه‌های گروه آزمون از روش مولکولی qPCR با تکثیر ژن cytb انگل پلاسمودیوم برگئی استفاده شد که در مقایسه با روش میکروسکوپی، حساسیت بیشتری نشان داد. نتایج تست qPCR نشان‌دهنده میزان زیاد آلودگی اسپوروزوئیتی در پشه‌ها بود. از مدل آزمایشگاهی ارائه‌شده در این مطالعه می‌توان در تحقیقات بعدی برای ارزیابی استراتژی‌های مسدودکننده انتقال یا بررسی برهم‌کنش انگل-پشه آنوفل استفاده کرد.

واژگان کلیدی: آنوفل استغفنی، اسپوروزوئیت، پلاسمودیوم برگئی، تست qPCR، مالاریا

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۰۴

ویرایش: ۱۴۰۵/۰۱/۲۴

پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۷

انتشار: ۱۴۰۵/۰۶/۱۵

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی کردستان محفوظ است.

*نویسنده مسئول: سکینه پیراحمدی، بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

ایمیل: s.pirahmadi2020@googlemail.com

#نویسندگان اول مشترک: زینب محمدی فیروز و زهرا سادات موسوی به‌میزان یکسان در تألیف این مقاله مشارکت داشته‌اند و هر دو به‌عنوان نویسنده اول در نظر گرفته می‌شوند.

استناد: محمدی فیروز، زینب؛ موسوی شفیعی، زهرا سادات؛ فروزش، فلورا؛ ابوئی مهریزی، اکرم؛ جوربندی ثانی، جعفر؛ یوسفی، هیمن؛ پیراحمدی، سکینه. توسعه یک مدل آزمایشگاهی آلودگی پشه آنوفل استغفنی به پلاسمودیوم برگئی و شناسایی مولکولی اسپوروزوئیت‌ها با استفاده از qPCR. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، مرداد و شهریور ۱۴۰۵، ۳۱(۳): ۲۳۹-۲۴۶.

پلاسمودیوم برگئی را انتقال دهد، بنابراین مدل پلاسمودیوم برگئی-موش بلب سی-آنوفل /ستفنی به عنوان مدل آزمایشگاهی رایج در بسیاری از تحقیقات مالاریا استفاده می شود [۵].

سیکل زندگی انگل پلاسمودیوم بسیار پیچیده و شامل مراحل مختلف است که در دو میزبان مهره دار (انسان و مهره داران دیگر) و بدون مهره (پشه آنوفل ماده) طی می شود. در بدن انسان، به دنبال گزش پشه آلوده، اسپوروزوئیت ها از جریان خون به سلول های کبدی مهاجرت می کنند. هنگامی که انگل ها وارد کبد می شوند، در آنجا تکثیر می شوند و سپس از آنجا خارج می شوند تا وارد چرخه رشد درون گلبول های قرمز شوند. در طول این مرحله، انگل ها به گلبول های قرمز حمله می کنند؛ جایی که به صورت غیرجنسی تکثیر می شوند و سپس گلبول قرمز را پاره می کنند و وارد گلبول های جدید می شوند و این چرخه ادامه می یابد. علائم بالینی مالاریا در این مرحله ایجاد می شود. در طول مرحله خونی، تعدادی از انگل ها به دلایل مختلف، از جمله استرس های محیطی، به فرم جنسی یا گامتوسیت تبدیل می شوند.

به دنبال گزش فرد مبتلا توسط پشه آنوفل، گامتوسیت ها وارد بدن پشه می شوند و درون معده پشه با تغییر شرایط محیطی، لقاح گامت های نر و ماده و تشکیل زیگوت رخ می دهد. به دنبال آن، فرم متحرک و تهاجمی اووکینت از زیگوت ایجاد می شود که با سوراخ کردن اپیتلیوم معده میانی، در زیر لایه بازال به اووکیست تبدیل می شود. بعد از گذشت چند روز، هزاران اسپوروزوئیت از اووکیست ها ایجاد می شود که ابتدا در همولنف ساکن می شود و سپس با تهاجم به غدد بزاقی پشه، در آنجا مستقر می شوند تا در خون خواری بعدی وارد بدن میزبان دیگر شوند و بدین ترتیب، سیکل زندگی پلاسمودیوم ادامه می یابد [۶].

استراتژی های مختلفی برای کنترل بیماری مالاریا مطرح شده است که از انواع آن ها می توان به مواردی از قبیل استراتژی های مبتنی بر کنترل ناقل، استفاده از داروهای خط اول درمان علیه پلاسمودیوم، توسعه روش های تشخیص سریع و با حساسیت زیاد، توسعه واکسن های ضد مالاریایی با کارایی زیاد و پایش مداوم گروه های پرخطر همانند زنان باردار و ... اشاره کرد [۷، ۸]. در سال های اخیر، استراتژی های مسدودکننده انتقال انگل، که بر چرخه جنسی انگل در بدن ناقل متمرکزند، پیشرفت های چشمگیری داشته اند. در این استراتژی ها، اجزای مهم سیکل جنسی انگل در بدن پشه ناقل هدف قرار می گیرند تا بتوان در نهایت انتقال مالاریا را از طریق ناقل کاهش داد. برای توسعه استراتژی های مسدودکننده انتقال، در مرحله نخست، باید بتوان نوعی مدل آزمایشگاهی طراحی کرد که انگل تا مرحله اسپوروزوئیتی قابلیت بقا داشته باشد و بتوان با روش های حساس مولکولی میزان آلودگی در مرحله غدد بزاقی را برآورد کرد. هدف

مالاریا نوعی بیماری عفونی است که بر اثر ابتلا به نوعی پاتوژن تک یاخته انگلی به نام پلاسمودیوم ایجاد می شود که با گزش پشه آنوفل ماده به میزبان مهره دار منتقل می شود. سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۲۴، در سراسر جهان، حدود ۲۸۲ میلیون مورد ابتلا به مالاریا در ۸۰ کشور اندمیک و مرگ حدود ۶۱۰ هزار نفر را گزارش داد. نواحی اندمیک این بیماری شامل مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان و به طور عمده، کشورهای آفریقایی و نواحی جنوبی قاره آسیاست [۱]. در ایران نیز با وجود اجرای برنامه حذف مالاریا از سال ۲۰۱۰، گزارش ها مبنی بر وجود بیماری به علت ورود مهاجران و کارگران مرزی به استان های جنوبی و جنوب شرقی کشور، به خصوص استان سیستان و بلوچستان هنوز وجود دارد و یک خطر مستمر شناخته می شود [۲].

انگل پلاسمودیوم، که عامل ایجادکننده بیماری مالاریاست، نه تنها انسان ها، بلکه مهره داران دیگر را نیز آلوده می کند. تا به امروز، بیش از دویست گونه از پلاسمودیوم شناخته شده است و هرگونه طیف خاصی از میزبان ها را آلوده می کند. گونه های پلاسمودیوم، که به طور طبیعی انسان را آلوده می کنند و باعث ایجاد مالاریا در مناطق وسیعی از جهان می شوند، به پنج گونه محدود می شوند که شامل پلاسمودیوم فالسیپاروم، پلاسمودیوم مالاریه، پلاسمودیوم ویواکس، پلاسمودیوم اوله و پلاسمودیوم ناولزی می شوند و از این بین، پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم از شایع ترین گونه ها در ایران هستند و بیشترین موارد ابتلا را به خود اختصاص می دهند [۳، ۴]. از آنجا که کشت دائمی انگل پلاسمودیوم تنها برای گونه پلاسمودیوم فالسیپاروم امکان پذیر است و برای گونه های دیگر این امکان وجود ندارد، در بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی از انگل های مالاریای جوندگان استفاده می شود.

از طرف دیگر، از میان پنج گونه انگل آلوده کننده انسان، تنها گونه پلاسمودیوم ناولزی، که به صورت زئونوز بین انسان و میمون مشترک است، قابلیت نگهداری در حیوان آزمایشگاهی را دارد. بنابراین، استفاده از انگل های جوندگان که به راحتی امکان نگهداری آن ها در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد، مطالعات آزمایشگاهی انگل مالاریا را تسهیل کرده است. انگل های مالاریای جوندگان به عنوان انگل های مدل بالارزش برای تحقیق زیست شناسی تکاملی انگل های مالاریا، برهم کنش انگل-میزبان، توسعه واکسن و تست های دارویی مطرح هستند. از میان انگل های مالاریای جوندگان، گونه پلاسمودیوم برگئی به دلیل شباهت چرخه زندگی، ساختار، خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژی با انگل های مالاریای انسانی، به طور گسترده در تحقیقات آزمایشگاهی مالاریا استفاده می شود [۵]. از آنجا که پشه آنوفل /ستفنی، که به عنوان مهم ترین ناقل مالاریا در مناطق جنوبی آسیا و خاورمیانه در نظر گرفته می شود، می تواند انگل

در هر فیلد میکروسکوپی (بزرگ‌نمایی ۴۰) ۱ تا ۳ گامتوسیت بالغ (exflagellation of gametocytes) مشاهده شد، زمان مناسب برای خون‌خواری پشه‌ها بود [۹،۱۰].

خون‌خواری پشه از موش‌های بی‌هوش‌شده (با کتامین و Xylazine: ۹۰ mg/kg; ۱۰ mg/kg) طبق شرایط استاندارد در دمای ۱۹ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ تا ۸۰ درصد انجام شد [۵]. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از خون‌خواری پشه‌ها، جداسازی پشه‌های خون‌خورده از پشه‌های دیگر انجام شد و سپس پشه‌های خون‌خورده در شرایط دمایی مشابه خون‌خواری به مدت ۲۴ روز نگهداری شدند.

بررسی حضور انگل در پشه‌های گروه آزمون با مشاهده میکروسکوپی

در روز ۱۰ بعد از خون‌خواری، پایش معده پشه‌های خون‌خورده به‌منظور بررسی وجود اووسیت‌ها انجام شد. برای این منظور، تشریح معده پشه‌ها انجام شد و سپس لام‌های حاوی معده زیرمیکروسکوپ نوری بررسی و اووسیت‌ها در معده پایش شدند. بعد از تأیید عفونت و وجود اووسیت در معده پشه‌ها، از روز ۱۷ تا ۲۴ بعد از خون‌خواری، غدد بزاقی پشه‌ها به‌منظور بررسی حضور اسپوروزوئیت‌ها پایش شدند.

تأیید عفونت اسپوروزوئیت‌ها در پشه‌های گروه آزمون با تست qPCR

برای تأیید نتایج میکروسکوپی به‌منظور بررسی فراوانی پشه‌های آلوده به انگل در گروه آزمون، تست qPCR با تکثیر اختصاصی ژن *cytochrome b (cytb)* انگل پلاسمودیوم برگئی انجام شد. برای انجام این تست سی پشه از بین پشه‌های گروه آزمون به‌صورت تصادفی انتخاب و سپس سر و قفسه سینه پشه‌ها به‌منظور استخراج DNA از بافت پشه‌ها تشریح شد. طراحی پرایمر با نرم افزار Oligo (نسخه ۷/۶) با استفاده از توالی ژن سویه مرجع ANKA (کد دسترسی: DQ-414645.1) انجام شد (جدول ۱). شایان ذکر است که برای اطمینان از تکثیر اختصاصی ژن *cytb* انگل پلاسمودیوم برگئی، تعداد ده پشه از گروه کنترل (پشه‌های تغذیه‌شده با موش سالم) انتخاب و با شرایط مشابه ذکرشده در بالا تست qPCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *cytb* انگل پلاسمودیوم برگئی انجام شد (گروه کنترل منفی).

این مطالعه توسعه نوعی مدل آزمایشگاهی پلاسمودیوم برگئی-موش بالبیسی-آنوفل/استفنیسی است که بتواند چرخه جنسی انگل را در بدن پشه ناقل تا مرحله اسپوروزوئیتی تکمیل کند. در این مطالعه از روش مولکولی qPCR برای افزایش دقت و حساسیت در تأیید حضور اسپوروزوئیت‌ها در پشه آنوفل/استفنیسی استفاده شده است.

روش کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی و روش گردآوری اطلاعات از نوع مطالعات کتابخانه‌ای و تجربیات آزمایشگاهی است. تمام مراحل کار با حیوان آزمایشگاهی براساس دستورالعمل کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران انجام شده است.

پرورش پشه آنوفل استفنیسی:

پشه‌های آنوفل/استفنیسی سوش چابهار در شرایط دمایی ۲۶ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ تا ۸۰ درصد با دوره روشنایی - تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در انسکتاریوم ملی واقع در انستیتو پاستور کرج نگهداری و پرورش داده شدند. تغذیه پشه‌ها با محلول قند ۱۰ درصد بود. پشه‌های بررسی‌شده شامل ۴۰۰ پشه ماده سه تا پنج‌روزه بودند که از ۲۴ ساعت قبل از خون‌خواری برای افزایش تمایل به خون‌خواری گرسنه نگه داشته شدند. هم‌زمان با پشه‌های گروه آزمون، که از موش آلوده به انگل خون‌خواری داشتند، پشه‌های گروه کنترل در شرایط یکسان از موش‌های سالم خون‌خواری انجام دادند.

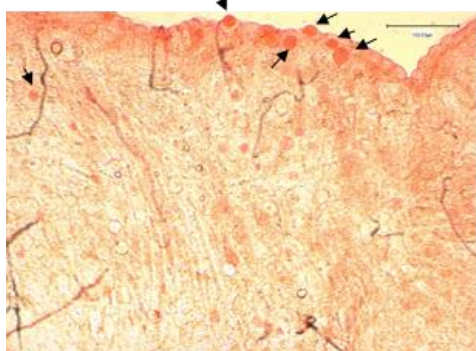
برقراری سیکل زندگی انگل پلاسمودیوم برگئی در شرایط آزمایشگاه

برای ایجاد عفونت در موش، میزان ۱۰^۶ انگل پلاسمودیوم برگئی (سوش ANKA 2.34) به موش‌های بالبیسی ماده با سن تقریبی چهار تا هشت هفته و وزن تقریبی ۱۷ تا ۲۰ گرم به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. به‌منظور افزایش تولید گامتوسیت، سه روز قبل از پاساژ انگل به موش‌ها phenylhydrazinium chloride (۱ درصد) به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. بعد از افزایش پارازیتمی در موش‌های دهنده انگل (حداقل میزان پارازیتمی ۱۰ درصد)، به موش‌هایی که برای خون‌خواری پشه استفاده شدند، خون آلوده تزریق شد. بعد از گذشت سه تا چهار روز، میزان پارازیتمی در موش‌های آلوده سنجیده شد. زمانی که

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر اختصاصی ژن *cytb* انگل پلاسمودیوم برگئی

نام پرایمر	توالی پرایمر (۵' به ۳')	دمای ذوب پرایمر (درجه سانتی‌گراد)	سایز محصول PCR (جفت باز)
PbF	TTATGGAGTGGATGGTGTTTTAG	۵۴/۷	۱۹۴
PbR	TGTCCCAAGGTAAAACATAAC	۵۵/۹	

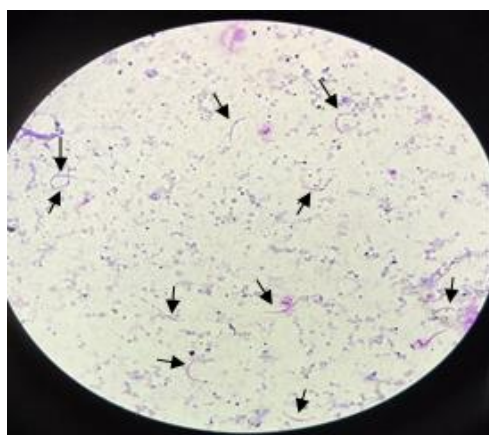
اوسپیست (در روز ۱۰) و غدد بزاقی از نظر وجود اسپوروزوئیت (روز ۲۴-۱۷) بررسی شدند. در بررسی معده پشه‌های گروه آزمون، از ۲۰ معده تشریح شده، ۱۹ معده میزان بالایی اوسپیست داشتند (فراوانی



عفونت: ۹۵ درصد (شکل ۱).

شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۲۰) معده رنگ آمیزی شده پشه گروه آزمون در روز ۱۰ بعد از خون‌خواری (فلش‌ها جایگاه اوسپیست‌ها را نشان می‌دهد)

در بررسی غدد بزاقی پشه‌ها و مشاهده میکروسکوپی غدد بزاقی رنگ آمیزی شده با گیمسا، مشخص شد که روز ۱۸ بعد از خون‌خواری، اولین زمان ورود اسپوروزوئیت‌ها به غدد بزاقی است و در روز ۲۱ بعد از خون‌خواری، آلودگی غدد بزاقی به حداکثر خود می‌رسد و بعد از آن، تا زمان زنده ماندن پشه‌ها، اسپوروزوئیت‌ها در غدد بزاقی باقی می‌مانند (شکل ۲).



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰۰) غدد بزاقی رنگ آمیزی شده در پشه گروه آزمون در روز ۲۱ بعد از خون‌خواری (فلش‌ها جایگاه اسپوروزوئیت‌ها را نشان می‌دهد)

تأیید آلودگی اسپوروزوئیت‌ها در پشه‌های گروه آزمون با روش qPCR

نتایج شمارش اسپوروزوئیت‌ها زیر لام نفوبار نشان داد که در ۳ نمونه کنترل مثبت (ترکیب ده تایی غدد بزاقی پشه‌های گروه آزمون) میانگین تعداد اسپوروزوئیت‌ها ۲۶/۰۰۰/۰۰۰ بود. نتایج آنالیز منحنی استاندارد روی نمونه کنترل مثبت عدد R^2 برابر با ۰/۹۸ و شیب خط

برای آنالیز منحنی استاندارد (Standard curve) در تست qPCR از روش ذکر شده در مطالعه راگ من و همکارانش در سال ۲۰۱۸ استفاده شد [۱۱]. به‌طور خلاصه، بعد از رقت‌سازی سریالی با ضریب ۱۰ نمونه کنترل مثبت (ترکیب ۱۰ جفت غده بزاقی که عفونت در آن‌ها مشاهده شده بود)، واکنش qPCR روی رقت‌های مختلف نمونه کنترل مثبت انجام شد. برای تعیین حد تشخیص سنجش (Assay's limit of detection)، میزان Cq حد تشخیص (Cq threshold limit of detection) به دست آمد (عدد Cq آخرین رقتی که تکثیر DNA در آن انجام می‌شود که این آخرین رقت به‌عنوان نمونه دارای اسپوروزوئیت در نظر گرفته می‌شود). نمونه‌هایی که عدد Cq آن‌ها بیشتر از Cq حد تشخیص باشد، به‌عنوان نمونه‌های منفی (فاقد آلودگی انگل) در نظر گرفته شدند. هر واکنش qPCR در حجم نهایی ۲۰ μ l انجام شد که شامل ۱۰ μ l از مستر میکس SYBR green (پارس توس، ایران)، غلظت ۵۰۰ nM هریک از پرایمرها و ۲ μ l از DNA الگو بود. مخلوط واکنش در دستگاه Rotor-Gene Q (کیژن، آلمان) طبق پروتکل دمایی ذیل انجام شد: انکوباسیون پانزده دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه، ۴۰ سیکل که شامل انکوباسیون ده ثانیه‌ای در دمای ۹۵، انکوباسیون ده ثانیه‌ای در دمای ۴۵ و در نهایت، انکوباسیون ده ثانیه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. به‌علاوه، برای اطمینان از تکثیر اختصاصی ژن مدنظر و اتصال اختصاصی پرایمرهای طراحی شده در انتهای واکنش PCR، آنالیز منحنی ذوب (Melt curve) در محدوده دمایی ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

آلوده کردن موش با گزش پشه‌های آلوده

برای بررسی قابلیت اسپوروزوئیت‌ها در آلودگی میزبان بعدی، از موش بلب سی ماده (چهار هفته، وزن تقریبی ۱۵ گرم) استفاده شد. به این منظور، در روز ۲۱ بعد از خون‌خواری ابتدا موش‌ها با استفاده از بیهوش‌کننده (کتامین و زایلازین با دوز Ketamine: 90 mg/kg; Xylazine: 10 mg/kg) بیهوش و روی قفس پشه‌های گروه آزمون به مدت بیست دقیقه قرار داده شدند. برای افزایش تمایل به خون‌خواری، پشه‌ها از شش ساعت قبل گرسنه بودند. تغذیه پشه‌ها از موش‌ها در همان شرایط دمایی ۱۹ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. از روز پنج بعد از گزش موش‌ها توسط پشه‌های آلوده، اسمیر خون محیطی از موش‌ها برای بررسی آلودگی آن‌ها با انگل انجام شد.

نتایج

آلودگی پشه‌ها به پلاسمودیوم برگئی

برای اطمینان از آلودگی پشه‌های گروه آزمون، تعدادی پشه به‌صورت تصادفی از این گروه انتخاب شدند و معده آن‌ها از نظر وجود

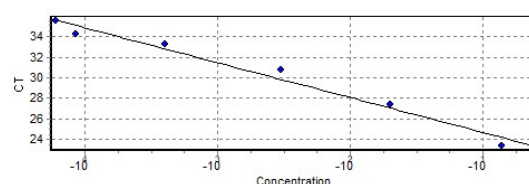
توسعه جنبه‌های مختلف تحقیق روی مالاریای انسان را فراهم می‌کند [۵]. ازجمله این تحقیقات می‌توان به بررسی برهم‌کنش پلاسمودیوم-پشه آنوفل، توسعه استراتژی‌های مسدودکننده انتقال، ایمنی مالاریا، مکانیسم‌های مقاومت دارویی و توسعه دارو و در نهایت، بررسی کارایی واکسن‌های درحال توسعه علیه مالاریا اشاره کرد.

در بسیاری از جنبه‌های تحقیقاتی در بیماری مالاریا از مدل آزمایشگاهی پلاسمودیوم برگئی-موش بلب سی-آنوفل/استفنیسی استفاده می‌شود که این مدل مستلزم تکمیل سیکل زندگی انگل در بدن جونده و ادامه مراحل تکامل آن در بدن پشه آنوفل است. بسیاری از استراتژی‌های مسدودکننده، انتقال مراحل مهم تکاملی انگل در بدن آنوفل را هدف قرار می‌دهند. ازجمله این مراحل، که به‌عنوان گلوگاه‌های تکاملی انگل محسوب می‌شوند، می‌توان به مرحله معده میانی و غدد بزاقی اشاره کرد. بنابراین، باید در توسعه مدل آزمایشگاهی پلاسمودیوم برگئی-موش بلب سی-آنوفل/استفنیسی تکمیل سیکل زندگی انگل تا انتهای مرحله غدد بزاقی (روز ۲۱ بعد از خون‌خواری) را مدنظر قرار داد. درحالی‌که بسیاری از مطالعات به شرایط بهینه‌سازی این مدل آزمایشگاهی و ایجاد آلودگی در پشه‌ها پرداخته‌اند، مطالعه حاضر با استفاده از روش مولکولی حساس qPCR، گام جدیدی در این زمینه برداشته است.

استفاده از روش qPCR در این مطالعه به‌طور ویژه توانسته است حساسیت بیشتری در تأیید آلودگی اسپوروزوئیتی در پشه‌ها ارائه دهد، که برخلاف روش میکروسکوپی، که معمولاً حساسیت کمتری دارد، دقیق‌تر و سریع‌تر است. این پیشرفت، به‌ویژه در تأیید میزان زیاد آلودگی اسپوروزوئیت‌ها در پشه‌ها، اهمیت ویژه‌ای دارد. آنالیز منحنی استاندارد با رقت‌های سریالی نمونه کنترل مثبت (ترکیب ده‌تایی غدد بزاقی آلوده در روز ۲۱ بعد از خون‌خواری) نشان‌دهنده محدوده نرمال شیب خط، R^2 و کارایی واکنش بود. نتایج تست qPCR نشان داد که تمامی سی پشه بررسی‌شده آلودگی زیادی با اسپوروزوئیت‌ها داشتند ($1.8 \times 10^4 \pm 2.3 \times 10^3$). بنابراین، نتایج تست qPCR در تأیید نتایج میکروسکوپی نشان‌دهنده میزان آلودگی زیاد اسپوروزوئیت‌ها در پشه‌ها بود. به‌علاوه، اسپوروزوئیت‌ها قابلیت زیادی در آلودگی میزبان بعدی داشتند (قابلیت آلوده‌سازی ۱۰۰ درصد) که نشان‌دهنده موفقیت مدل آزمایشگاهی پلاسمودیوم برگئی-موش بلب سی-آنوفل/استفنیسی در مطالعه حاضر است.

در این مطالعه برای اولین بار زمان‌بندی دقیق آلودگی غدد بزاقی با اسپوروزوئیت‌ها مشخص شده است. نتایج نشان داد که آلودگی غدد بزاقی از روز ۱۸ پس از خون‌خواری آغاز می‌شود و در روز ۲۱ به حد اکثر می‌رسد. این یافته، که تاکنون در هیچ مطالعه‌ای گزارش نشده است، می‌تواند در بهینه‌سازی زمان‌بندی مطالعات انتقال انگل و طراحی استراتژی‌های مسدودکننده انتقال استفاده شود. بنابراین، مطالعه حاضر نه‌تنها به تکمیل مدل‌های آزمایشگاهی موجود کمک می‌کند، بلکه با معرفی روش qPCR، می‌تواند در بهبود ارزیابی انتقال انگل و طراحی استراتژی‌های کنترلی نقش مؤثری داشته باشد. مطالعات گوناگون نشان داده‌اند برای آنکه سیکل زندگی انگل

برابر با $3/38$ - را نشان داد (شکل ۳) و Cq حد تشخیص ۳۴ به دست آمد. همچنین، برای بررسی تکثیر اختصاصی ژن *cytb* آنالیز منحنی ذوب نیز انجام شد که نشان داد تمامی نمونه‌ها به‌صورت تک‌پیک در محدوده 77.0 ± 0.33 درجه سانتی‌گراد هستند. بررسی آلودگی پشه‌های بررسی‌شده با روش qPCR نشان داد که تمامی سی پشه بررسی‌شده (فراوانی ۱۰۰ درصد) دارای اسپوروزوئیت بودند (عدد Cq آن‌ها کمتر از Cq حد تشخیص بود). میانگین عدد Cq در تست qPCR 18.84 ± 2.33 بود که این موضوع نشان‌دهنده میزان بالای عفونت غدد بزاقی پشه‌ها با اسپوروزوئیت است. شایان ذکر است تمامی ده پشه بررسی‌شده از گروه کنترل منفی عدد Cq بالاتر از ۳۴



داشتند که نشان‌دهنده تکثیرنشدن ژن *cytb* انگل پلاسمودیوم برگئی در پشه‌های گروه کنترل منفی و آلوده‌نبودن آن‌ها بود.

شکل ۳. آنالیز منحنی استاندارد نمونه کنترل مثبت در تست qPCR (آنالیز منحنی استاندارد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *cytb* انگل پلاسمودیوم برگئی در گروه آزمون انجام شد. آنالیز منحنی استاندارد عدد R^2 برابر با 0.98 و شیب خط برابر با $3/38$ - را نشان داد)

آلودگی موش با گزش پشه‌های آلوده

نتایج بررسی اسمیر موش‌ها نشان داد که تمامی موش‌هایی که برای خون‌خواری پشه‌های آلوده استفاده شدند، از روز ۵ به بعد به انگل پلاسمودیوم برگئی آلوده بودند (قابلیت آلودگی ۱۰۰ درصد). انگل‌های فوق تحت عنوان انگل پاساژ صفر هستند که می‌توانند در مطالعات بعدی برای توسعه مدل آزمایشگاهی پلاسمودیوم برگئی-موش بلب سی-آنوفل/استفنیسی استفاده شوند

بحث

با معرفی انگل پلاسمودیوم برگئی به آزمایشگاه، مالاریای جوندگان سهم قابل‌توجهی در مطالعات زیست‌شناسی و ایمونولوژی انگل پلاسمودیوم ایجاد کرده است. عوامل مختلفی در افزایش پتانسیل این انگل در تحقیقات بیماری مالاریا نقش دارد که ازجمله آن‌ها می‌توان به دسترسی راحت به جوندگان آزمایشگاهی که به‌عنوان میزبان این انگل عمل می‌کنند، فراوانی گونه‌های ناقل انتقال‌دهنده این انگل که شامل انواعی از گونه‌های اصلی ناقل در آفریقا، آسیا و آمریکای جنوبی می‌شود و دردسترس بودن ژنوم انگل اشاره کرد [۵]. با توجه به مخاطره‌آمیز نبودن انگل پلاسمودیوم برگئی برای انسان و شباهت‌های ساختاری، فیزیولوژی و چرخه زندگی آن به انگل‌های مالاریای انسانی، این انگل امروزه به‌عنوان مدل تجربی برای مطالعه روی مالاریای پستانداران کاربرد زیادی دارد [۱۲]. دامنه گسترده تحقیقات با استفاده از انگل پلاسمودیوم برگئی، امکان

[۱۶]

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نوعی مدل آزمایشگاهی موفق پلاسمودیوم برگئی-موش بلب سی-آنوفل/استغفنی توسعه یافت. فاکتورهای مختلفی در موفقیت آمیز بودن مدل آزمایشگاهی فوق و تکمیل سیکل زندگی انگل تا مرحله غدد بزاقی در پشه آنوفل مؤثر است که با رعایت آن‌ها می‌توان احتمال موفقیت این مدل و قابلیت انتقال آلودگی به میزبان مهره‌دار بعدی را افزایش داد. در این مطالعه برای تأیید آلودگی اسپوروزوئیت‌ها در پشه‌های گروه آزمون، تست qPCR با تکثیر اختصاصی ژن *cytb* انگل پلاسمودیوم برگئی توسعه یافت که نتایج در تأیید نتایج میکروسکوپی نشان‌دهنده آلودگی زیاد پشه‌ها با اسپوروزوئیت‌های انگل پلاسمودیوم برگئی بود. از این مدل می‌توان برای ارزیابی استراتژی‌های مسدودکننده انتقال یا بررسی برهم‌کنش انگل-پشه آنوفل در مطالعات بعدی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از تمام افرادی که در اجرای این پروژه کمک کردند و مشاوره علمی دادند، به‌ویژه جناب آقای دکتر حسین دهقان، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی هیئت علمی با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران (طرح پژوهشی شماره ۱۳۱۹) و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (طرح پژوهشی ۴۰۱۳۸۷۰) انجام شده است. کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران (IR.PII.AEC.1401.009) این پروژه را تأیید کرده است. مقاله فوق مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

تضاد منافع

هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه تعارض منافی برای انتشار مقاله ندارند.

به‌درستی در بدن پشه ایجاد شود و تا مرحله انتهایی تکاملی انگل (مرحله آلودگی غدد بزاقی پشه) باقی بماند، باید جوندگی که برای خون‌خواری پشه و ایجاد آلودگی در بدن پشه استفاده می‌شود، گامتوسیت بالغ و فعال داشته باشد [۹، ۱۰]. مهم‌ترین فاکتوری که در مقالات مرتبط با این موضوع مطرح شده است، تعداد مراکز اکسفلاژلاسیون (که نشان‌دهنده تاژک‌دار شدن گامتوسیت نر و بلوغ آن است) در نمونه جمع‌آوری شده از موش آلوده در روز خون‌خواری است. نتایج این مطالعه نشان داد که بهترین حالت در توسعه این مدل آزمایشگاهی زمانی رخ می‌دهد که تعداد مراکز اکسفلاژلاسیون یک تا سه مرکز در هر فیلد میکروسکوپی باشد که در این حالت، تعداد پشه‌های آلوده به میزان قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. این یافته همسو با مطالعات قبلی در این زمینه است که نشان می‌دهد زمانی که پشه از موش آلوده به گامتوسیت با فراوانی نسبتاً پایین تعداد مراکز اکسفلاژلاسیون (کمتر از سه مرکز) خون‌خواری می‌کند، فراوانی پشه‌های آلوده به انگل افزایش می‌یابد [۹، ۱۳]. به‌علاوه، این موضوع در موفقیت سیکل انگل تا مرحله انتهایی تکاملی (مرحله آلودگی غدد بزاقی پشه) نقش مهمی دارد؛ زیرا زمانی که انگل بتواند گلوگاه‌های مهم تکاملی را در بدن پشه ناقل طی کند، به احتمال زیاد سیکل تکاملی خود را تا مرحله انتهایی به اتمام می‌رساند و قابلیت انتقال به میزبان بعدی را دارد [۱۴، ۱۵].

نتایج ما در تأیید آلودگی پشه‌ها نشان داد زمانی که از موش آلوده دارای گامتوسیت بالغ (تعداد یک تا سه مرکز اکسفلاژلاسیون در هر فیلد میکروسکوپی) خون‌خواری انجام شد، عفونت به میزان بالا در تمامی پشه‌های مورد بررسی ایجاد شد. به‌علاوه، انگل قادر به بقا تا مرحله اسپوروزوئیتی در غدد بزاقی پشه بود و پشه‌ها همگی حاوی اسپوروزوئیت‌ها به فرم فعال بودند که قابلیت بیماری‌زایی در میزبان بعدی را داشتند. در واقع، شرط توسعه مدل آزمایشگاهی برای مطالعه بیماری مالاریا، ایجاد عفونت به میزان بالا در بدن پشه با فرم فعال انگل است که بتواند میزبان‌های بعدی را آلوده کند. این نتیجه در جهت نتایج مطالعات قبلی بود که نشان می‌داد زمانی که گامتوسیت فعال در خون موش وجود داشته باشد و پشه از آن خون‌خواری کند، میزان زیاد عفونت در پشه ایجاد خواهد شد [۱۱].

REFERENCES

- World Health Organization. World malaria report 2025. Geneva: World Health Organization; 2025. [Link]
- World Health Organization. Zeroing in on malaria elimination: final report of the E-2020 initiative. Geneva: World Health Organization; 2021. [Link]
- Sato S. Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. J Physiol Anthropol. 2021;40(1):1. [DOI: 10.1186/s40101-020-00251-9]
- Sanei-Dehkordi A, Soleimani-Ahmadi M, Jaberhashemi SA, Zare M. Species composition, seasonal abundance and distribution of potential anopheline vectors in a malaria endemic area of Iran: field assessment for malaria elimination. Malaria J. 2019;18:1-9. [DOI: 10.1186/s12936-019-2795-x]
- Dehghan H, Oshaghi MA, Nateghpour M, Mohammadzade H. The plasmodia of rodents: introduction to Plasmodium berghei. 1st ed. Jiroft: Jiroft University of Medical Sciences; 2020. [Link]
- Frischknecht F, Matuschewski K. Plasmodium sporozoite biology. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7(5):a025478. [DOI: 10.1101/cshperspect.a025478]
- Bannister L, Hopkins J, Fowler R, Krishna S, Mitchell G. A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. Parasitol

- Today. 2000;16(10):427-33. [DOI: 10.1016/S0169-4758(00)01755-5]
8. Charavanamuttu Y, Agyeman Wamba A, Taylor-Robinson AW, Lampejo T. The Evolving Landscape of Malaria Prevention Strategies: A Review of Recent Developments. *Pathogens*. 2026; 15(2):137. [DOI: 10.3390/pathogens15020137]
 9. Dehghan H, Oshaghi MA, Mosa-Kazemi SH, Abai MR, Rafie F, Nateghpour M, et al. Experimental study on *Plasmodium berghei*, *Anopheles stephensi*, and BALB/c mouse system: implications for malaria transmission blocking assays. *Iran J Parasitol*. 2018;13(4):549-59. [Link]
 10. Sinden RE, Butcher GA, Beetsma AL. Maintenance of the *Plasmodium berghei* life cycle. *Methods Mol Med*. 2002;72:25-40. [DOI: 10.1385/1-59259-271-6:25]
 11. Brugman V, Kristan M, Gibbins M, Angrisano F, Sala K, Dessens J, et al. Detection of malaria sporozoites expelled during mosquito sugar feeding. *Sci Rep*. 2018;8(1):7545. [DOI: 10.1038/s41598-018-26010-6]
 12. Goodman AL, Forbes EK, Williams AR, Douglas AD, de Cassan SC, Bauza K, Biswas S, Dicks MD, Llewellyn D, Moore AC, Janse CJ, Franke-Fayard BM, Gilbert SC, Hill AV, Pleass RJ, Draper SJ. The utility of *Plasmodium berghei* as a rodent model for anti-merozoite malaria vaccine assessment. *Sci Rep*. 2013;3:1706. [DOI: 10.1038/srep01706]
 13. Arai M, Billker O, Morris HR, Panico M, Delcroix M, Dixon D, et al. Both mosquito-derived xanthurenic acid and a host blood-derived factor regulate gametogenesis of *Plasmodium* in the midgut of the mosquito. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;116(1):17-24. [DOI: 10.1016/S0166-6851(01)00299-7]
 14. Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today*. 2000;16(5):196-201. [DOI: 10.1016/S0169-4758(99)01626-9]
 15. Hillyer JF, Barreau C, Vernick KD. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *Int J Parasitol*. 2007;37(6):673-81. [DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.12.007]
 16. Liew JW, Fong MY, Lau YL. Quantitative real-time PCR analysis of *Anopheles dirus* TEP1 and NOS during *Plasmodium berghei* infection, using three reference genes. *PeerJ*. 2017;5:e3577. [DOI: 10.7717/peerj.3577]