SJKUMS
Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences
No.3/ Aug-Sep 2026;31(3):239-246
DOI: 10.22034/31.3.239
https://sjku.muk.ac.ir



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 Forouzesh[3], Akram Abouie Mehrizi[4], Jafar Joorbandi Sani[5], Hemn Yousefi[6], 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@googlemail.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 to blood-feed 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

Copyright © 2026 Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. *This is an open-access article distributed* under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0) (*https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/*), which permits copying, redistributing, and reusing the material for non-commercial purposes, provided that the original work is properly cited and the source and journal are acknowledged.

SJKUMS
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان
دوره ۳۱، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۴۰۵،صفحات: ۲۳۹-۲۴۶
DOI: 10.22034/31.3.239
https://sjku.muk.ac.ir



مقاله پژوهشی

توسعهٔ یک مدل آزمایشگاهی آلودگی پشهٔ آنوفل استفنسی به پلاسمودیوم برگئی و شناسایی مولکولی اسپوروزوئیت‌ها با استفاده از qPCR

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

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، واحد علوم پزشکی 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

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 نویسندهٔ اول در نظر گرفته می‌شوند.

چکیده

زمینه و هدف: مالاریا نوعی بیماری عفونی شایع است که براثر ابتلا به پاتوژنی به نام پلاسمودیوم ایجاد می‌شود که با گزش پشهٔ آنوفل ماده به میزبان مهره‌دار منتقل می‌شود. هدف این مطالعه توسعهٔ مدل آزمایشگاهی پلاسمودیوم برگئی-موش بالب سی-آنوفل استفنسی با تأکید بر کاربرد روش حساس qPCR برای تشخیص عفونت اسپوروزوئیت‌های پلاسمودیوم برگئی در آنوفل استفنسی است.

مواد و روش‌ها: موش بالب سی ماده آلوده به پلاسمودیوم برگئی برای خون‌خواری پشه های آنوفل استفنسی استفاده شد. سپس، پشه‌ها به‌مدت ۲۴ روز در دمای ۱۹ تا ۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ تا ۸۰ درصد نگهداری شدند. به‌منظور بررسی حضور اسپوروزوئیت‌ها، غدد بزاقی پشه‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. به‌منظور 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 بالب 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 (۲/۳۳±۱۸/۸۴) بود. نتایج آنالیز منحنی استاندارد روی نمونهٔ 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. به‌علاوه، 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 نشان‌دهندهٔ میزان زیاد آلودگی اسپوروزوئیتی در پشه‌ها بود. از مدل آزمایشگاهی ارائه‌شده در این مطالعه می‌توان در تحقیقات بعدی برای ارزیابی استراتژی‌های مسدودکنندهٔ انتقال یا بررسی برهم‌کنش انگل-پشهٔ آنوفل استفاده کرد.

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

استناد: محمدی فیروز، زینب؛ موسوی شفیع، زهرا سادات؛ فروزش، فلورا؛ ابوئی مهریزی، اکرم؛ جوربندی ثانی، جعفر؛ یوسفی، هیمن، پیراحمدی، سکینه. توسعهٔ یک مدل آزمایشگاهی آلودگی پشهٔ آنوفل استفنسی 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

مقدمه

مالاریا نوعی بیماری عفونی است که براثر ابتلا به نوعی پاتوژن تک‌یاختهٔ انگلی به نام پلاسمودیوم ایجاد می‌شود که با گزش پشهٔ آنوفل ماده به میزبان مهره‌دار منتقل می‌شود. 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 نیمه‌گرمسیری جهان و به‌طور عمده، کشورهای آفریقایی و نواحی جنوبی قارهٔ آسیاست [۱]. در ایران نیز باوجود اجرای برنامهٔ حذف مالاریا از سال ۲۰۱۰، گزارش‌ها مبنی‌بر وجود بیماری به‌علت ورود مهاجران و کارگران مرزی به استان‌های جنوبی و جنوب شرقی کشور، به‌خصوص استان سیستان و بلوچستان هنوز وجود دارد و یک خطر مستمر شناخته می‌شود [۲].

انگل پلاسمودیوم، که عامل ایجادکنندهٔ بیماری مالاریاست، نه‌تنها انسان‌ها، بلکه مهره‌داران دیگر را نیز آلوده می‌کند. تا به امروز، بیش از دویست گونه از پلاسمودیوم شناخته شده است و هرگونه طیف خاصی از میزبان‌ها را آلوده می‌کند. گونه‌های پلاسمودیوم، که به‌طور طبیعی انسان را آلوده می‌کنند و باعث ایجاد مالاریا در مناطق وسیعی از جهان می‌شوند، به پنج گونه محدود می‌شوند که شامل *پلاسمودیوم فالسیپاروم*، *پلاسمودیوم مالاریه*، *پلاسمودیوم ویواکس*، *پلاسمودیوم اوالِه* و *پلاسمودیوم ناولزی* می‌شوند و از این بین، *پلاسمودیوم* ویواکس و پلاسمودیوم *فالسیپاروم* از شایع‌ترین گونه‌ها در ایران هستند و بیشترین موارد ابتلا را به خود اختصاص می‌دهند [۳، ۴]. ازآنجاکه کشت دائمی انگل پلاسمودیوم تنها برای گونهٔ *پلاسمودیوم فالسیپاروم* امکان‌پذیر است و برای گونه‌های دیگر این امکان وجود ندارد، در بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی از انگل‌های مالاریای جوندگان استفاده می‌شود.

از طرف دیگر، از میان پنج گونه انگل آلوده‌کنندهٔ انسان، تنها گونهٔ *پلاسمودیوم ناولزی*، که به‌صورت زئونوز بین انسان و میمون مشترک است، قابلیت نگهداری در حیوان آزمایشگاهی را دارد. بنابراین، استفاده از انگل‌های جوندگان که به‌راحتی امکان نگهداری آن‌ها در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد، مطالعات آزمایشگاهی انگل مالاریا را تسهیل کرده است. انگل‌های مالاریای جوندگان به‌عنوان انگل‌های مدل باارزش برای تحقیق زیست‌شناسی تکاملی انگل‌های مالاریا، برهم‌کنش انگل-میزبان، توسعهٔ واکسن و تست‌های دارویی مطرح هستند. از میان انگل‌های مالاریای جوندگان، گونهٔ *پلاسمودیوم برگئی* به‌دلیل شباهت چرخهٔ زندگی، ساختار، خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژی با انگل‌های مالاریای انسانی، به‌طور گسترده در تحقیقات آزمایشگاهی مالاریا استفاده می‌شود [۵]. ازآنجاکه پشهٔ آنوفل *استفنسی*، که به‌عنوان مهم‌ترین ناقل مالاریا در مناطق جنوبی آسیا و خاورمیانه در نظر گرفته می‌شود، می‌تواند انگل *پلاسمودیوم برگئی* را انتقال دهد، بنابراین مدل *پلاسمودیوم برگئی*-موش بالب سی-*آنوفل استفنسی* به‌عنوان مدل آزمایشگاهی رایج در بسیاری از تحقیقات مالاریا استفاده می‌شود [۵].

سیکل زندگی انگل پلاسمودیوم بسیار پیچیده و شامل مراحل مختلف است که در دو میزبان مهره‌دار (انسان و مهره‌داران دیگر) و بدون مهره (پشهٔ آنوفل ماده) طی می‌شود. در بدن انسان، به‌دنبال گزش پشهٔ آلوده، اسپوروزوئیت‌ها از جریان خون به سلول‌های کبدی مهاجرت می‌کنند. هنگامی که انگل‌ها وارد کبد می‌شوند، در آنجا تکثیر می‌شوند و سپس از آنجا خارج می‌شوند تا وارد چرخهٔ رشد درون گلبول‌های قرمز شوند. در طول این مرحله، انگل‌ها به گلبول‌های قرمز حمله می‌کنند؛ جایی که به‌صورت غیرجنسی تکثیر می‌شوند و سپس گلبول قرمز را پاره می‌کنند و وارد گلبول‌های جدید می‌شوند و این چرخه ادامه می‌یابد. علائم بالینی مالاریا در این مرحله ایجاد می‌شود. در طول مرحلهٔ خونی، تعدادی از انگل‌ها به‌دلایل مختلف، ازجمله استرس‌های محیطی، به فرم جنسی یا گامتوسیت تبدیل می‌شوند.

به‌دنبال گزش فرد مبتلا توسط پشهٔ آنوفل، گامتوسیت‌ها وارد بدن پشه می‌شوند و درون معدهٔ پشه با تغییر شرایط محیطی، لقاح گامت‌های نر و ماده و تشکیل زیگوت رخ می‌دهد. به‌دنبال آن، فرم متحرک و تهاجمی اووکینت از زیگوت ایجاد می‌شود که با سوراخ‌کردن اپیتلیوم معدهٔ میانی، در زیر لایهٔ بازال به اووسیست تبدیل می‌شود. بعد از گذشت چند روز، هزاران اسپوروزوئیت از اووسیست‌ها ایجاد می‌شود که ابتدا در همولنف ساکن می‌شود و سپس با تهاجم به غدد بزاقی پشه، در آنجا مستقر می‌شوند تا در خون‌خواری بعدی وارد بدن میزبان دیگر شوند و بدین ترتیب، سیکل زندگی پلاسمودیوم ادامه می‌یابد [۶].

استراتژی‌های مختلفی برای کنترل بیماری مالاریا مطرح شده است که از انواع آن‌ها می‌توان به مواردی از قبیل استراتژی‌های مبتنی‌بر کنترل ناقل، استفاده از داروهای خط اول درمان علیه پلاسمودیوم، توسعهٔ روش‌های تشخیص سریع و با حساسیت زیاد، توسعهٔ واکسن‌های ضد مالاریایی با کارایی زیاد و پایش مداوم گروه‌های پرخطر همانند زنان باردار و ... اشاره کرد [۷، ۸]. در سال‌های اخیر، استراتژی‌های مسدودکنندهٔ انتقال انگل، که بر چرخهٔ جنسی انگل در بدن ناقل متمرکزند، پیشرفت‌های چشمگیری داشته‌اند. در این استراتژی‌ها، اجزای مهم سیکل جنسی انگل در بدن پشهٔ ناقل هدف قرار می‌گیرند تا بتوان در نهایت انتقال مالاریا را از طریق ناقل کاهش داد. برای توسعهٔ استراتژی‌های مسدودکنندهٔ انتقال، در مرحلهٔ نخست، باید بتوان نوعی مدل آزمایشگاهی طراحی کرد که انگل تا مرحلهٔ اسپوروزوئیتی قابلیت بقا داشته باشد و بتوان با روش‌های حساس مولکولی میزان آلودگی در مرحلهٔ غدد بزاقی را برآورد کرد. هدف

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

این مطالعه توسعهٔ نوعی مدل آزمایشگاهی *پلاسمودیوم برگئی*-موش بالب‌سی-*آنوفل استفنسی* است که بتواند چرخهٔ جنسی انگل را در بدن پشهٔ ناقل تا مرحلهٔ اسپوروزوئیتی تکمیل کند. در این مطالعه از روش مولکولی qPCR برای افزایش دقت و حساسیت در تأیید حضور اسپوروزوئیت‌ها در پشهٔ آنوفل *استفنسی* استفاده شده است.

روش کار

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

پرورش پشهٔ آنوفل استفنسی:

پشه‌های *آنوفل استفنسی* سوش چابهار در شرایط دمایی ۲۶ تا ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ تا ۸۰ درصد با دورهٔ روشنایی ـ تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در انسکتاریوم ملی واقع در انستیتو پاستورکرج نگهداری و پرورش داده شدند. تغذیهٔ پشه‌ها با محلول قند ۱۰ درصد بود. پشه‌های بررسی‌شده شامل ۴۰۰ پشهٔ مادهٔ 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 10^6 انگل *پلاسمودیوم برگئی* (سوش ANKA 2.34) به موش‌های بالب سی 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 دهندهٔ 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 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 زایلازین با دوز Ketamine: 90 mg/kg; Xylazine: 10 mg/kg) طبق شرایط استاندارد در دمای ۱۹ تا ۲۱ درجهٔ 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 به‌مدت ۲۴ روز نگهداری شدند.

بررسی حضور انگل در پشه‌های گروه آزمون با مشاهدهٔ میکروسکوپی

در روز ۱۰ بعد از خون‌خواری، پایش معدهٔ پشه‌های خون‌خورده به‌منظور بررسی وجود اووسیست‌ها انجام شد. برای این منظور، تشریح معدهٔ پشه‌ها انجام شد و سپس لام‌های حاوی معده زیرمیکروسکوپ نوری بررسی و اووسیست‌ها در معده پایش شدند. بعد از تأیید عفونت و وجود اووسیست در معدهٔ 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 قفسهٔ سینهٔ پشه‌ها به‌منظور استخراج DNA از بافت پشه‌ها تشریح شد. طراحی پرایمر با نرم افزار Oligo (نسخه ۷/۶) با استفاده از توالی ژن سویهٔ 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).

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

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

برای آنالیز منحنی استاندارد (Standard curve) در تست qPCR از روش ذکرشده در مطالعهٔ راگ من و همکارانش در سال ۲۰۱۸ استفاده شد [۱۱]. به‌طور خلاصه، بعد از رقت‌سازی سریالی با ضریب ۱۰ نمونهٔ کنترل مثبت (ترکیب ۱۰ جفت غدهٔ بزاقی که عفونت در آن‌ها مشاهده شده بود)، واکنش qPCR روی رقت‌های مختلف نمونهٔ 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 نمونهٔ 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 µl انجام شد که شامل ۱۰ µl از مستر میکس SYBR green (پارس توس، ایران)، غلظت 500 nM هریک از پرایمرها و ۲ µl از DNA الگو بود. مخلوط واکنش در دستگاه Rotor-Gene Q (کیاژن، آلمان) طبق پروتکل دمایی ذیل انجام شد: انکوباسیون پانزده‌دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه، ۴۰ سیکل که شامل انکوباسیون ده‌ثانیه‌ای در دمای ۹۵، انکوباسیون ده‌ثانیه‌ای در دمای ۴۵ و در نهایت، انکوباسیون ده‌ثانیه‌ای در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد بود. به‌علاوه، برای اطمینان از تکثیر اختصاصی ژن مدنظر و اتصال اختصاصی پرایمرهای طراحی‌شده در انتهای واکنش PCR، آنالیز منحنی ذوب (Melt curve) در محدودهٔ دمایی ۶۵ تا ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد.

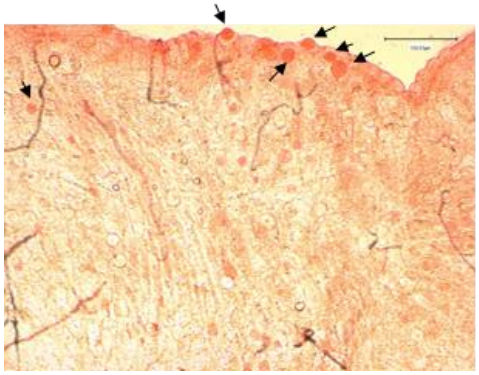
آلوده‌کردن موش با گزش پشه‌های آلوده

برای بررسی قابلیت اسپوروزوئیت‌ها در آلودگی میزبان بعدی، از موش بالب 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 به‌مدت بیست دقیقه قرار داده شدند. برای افزایش تمایل به خون‌خواری، پشه‌ها از شش ساعت قبل گرسنه بودند. تغذیهٔ پشه‌ها از موش‌ها در همان شرایط دمایی ۱۹ تا ۲۱ درجهٔ سانتی گراد 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*

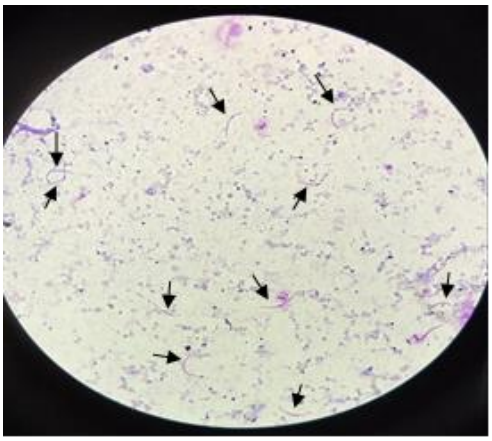
برای اطمینان از آلودگی پشه‌های گروه آزمون، تعدادی پشه به‌صورت تصادفی از این گروه انتخاب شدند و معدهٔ آن‌ها از نظر وجود اووسیست (در روز ۱۰) و غدد بزاقی از نظر وجود اسپوروزوئیت (روز ۲۴-۱۷) بررسی شدند. در بررسی معدهٔ پشه‌های گروه آزمون، از ۲۰ معدهٔ تشریح‌شده، ۱۹ معده میزان بالایی اووسیست داشتند (فراوانی



عفونت: ۹۵ درصد) (شکل ۱).

شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ۲۰) معدهٔ رنگ‌آمیزی‌شده پشه گروه آزمون در روز ۱۰ بعد از خون‌خواری (فلش‌ها جایگاه اووسیست‌ها را نشان می‌دهد)

در بررسی غدد بزاقی پشه‌ها و مشاهدهٔ میکروسکوپی غدد بزاقی رنگ‌آمیزی‌شده 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 زنده‌ماندن پشه‌ها، اسپوروزوئیت‌ها در غدد بزاقی باقی می‌مانند (شکل ۲).



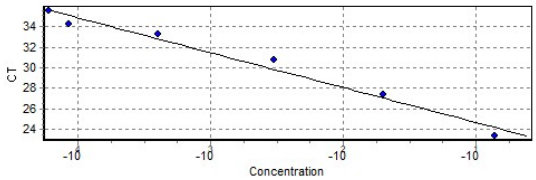
شکل ۲. تصویر میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ۱۰۰) غدد بزاقی رنگ‌آمیزی‌شده در پشهٔ گروه آزمون در روز ۲۱ بعد از خون‌خواری (فلش‌ها جایگاه اسپوروزوئیت‌ها را نشان می‌دهد)

تأیید آلودگی اسپوروزوئیت‌ها در پشه‌های گروه آزمون با روش qPCR

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

برابر با ۳/۳۸- 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 ۰/۳۳±۷۷/۰۳ درجه سانتی‌گراد هستند. بررسی آلودگی پشه‌های بررسی‌شده با روش qPCR نشان داد که تمامی سی پشهٔ بررسی‌شده (فراوانی ۱۰۰ درصد) دارای اسپوروزوئیت بودند (عدد Cq آن‌ها کمتر از Cq حد تشخیص بود). میانگین عدد Cq در تست qPCR ۲/۳۳±۱۸/۸۴ بود که این موضوع نشان‌دهندهٔ میزان بالای عفونت غدد بزاقی پشه‌ها با اسپوروزوئیت است. شایان ذکر است تمامی ده پشهٔ بررسی‌شده از گروه کنترل منفی عدد Cq بالاتر از ۳۴



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

شکل ۳. آنالیز منحنی استاندارد نمونهٔ 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 R2 برابر با ۰/۹۸ و شیب خط برابر با ۳/۳۸- 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 توسعهٔ مدل آزمایشگاهی *پلاسمودیوم برگئی*-موش بالب سی-*آنوفل استفنسی* 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 ازجملهٔ آن‌ها می‌توان به دسترسی راحت به جوندگان آزمایشگاهی که به‌عنوان میزبان این انگل عمل می‌کنند، فراوانی گونه‌های ناقل انتقال‌دهندهٔ این انگل که شامل انواعی از گونه‌های اصلی ناقل در آفریقا، آسیا و آمریکای جنوبی می‌شود و دردسترس‌بودن ژنوم انگل اشاره کرد [۵]. با توجه به مخاطره‌آمیزنبودن انگل *پلاسمودیوم برگئی* برای انسان و شباهت‌های ساختاری، فیزیولوژی و چرخهٔ زندگی آن به انگل‌های مالاریای انسانی، این انگل امروزه به‌عنوان مدل تجربی برای مطالعه روی مالاریای پستانداران کاربرد زیادی دارد [۱۲]. دامنهٔ گسترده تحقیقات با استفاده از انگل *پلاسمودیوم برگئی*، امکان توسعهٔ جنبه‌های مختلف تحقیق روی مالاریای انسان را فراهم می‌کند [۵]. ازجملهٔ این تحقیقات می‌توان به بررسی برهم‌کنش پلاسمودیوم-پشهٔ آنوفل، توسعهٔ استراتژی‌های مسدودکنندهٔ انتقال، ایمنی مالاریا، مکانیسم‌های مقاومت دارویی و توسعهٔ دارو و در نهایت، بررسی کارایی واکسن‌های درحال‌توسعهٔ علیه مالاریا اشاره کرد.

در بسیاری از جنبه‌های تحقیقاتی در بیماری مالاریا از مدل آزمایشگاهی *پلاسمودیوم برگئی*-موش بالب سی-*آنوفل استفنسی* استفاده می‌شود که این مدل مستلزم تکمیل سیکل زندگی انگل در بدن جونده و ادامهٔ مراحل تکامل آن در بدن پشهٔ آنوفل است. بسیاری از استراتژی‌های مسدودکننده، انتقال مراحل مهم تکاملی انگل در بدن آنوفل را هدف قرار می‌دهند. ازجملهٔ این مراحل، که به‌عنوان گلوگاه‌های تکاملی انگل محسوب می‌شوند، می‌توان به مرحلهٔ معدهٔ میانی و غدد بزاقی اشاره کرد. بنابراین، باید در توسعهٔ مدل آزمایشگاهی *پلاسمودیوم برگئی*-موش بالب سی-*آنوفل استفنسی* تکمیل سیکل زندگی انگل تا انتهای مرحلهٔ 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، مطالعهٔ 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 نمونهٔ کنترل مثبت (ترکیب ده‌تایی غدد بزاقی آلوده در روز ۲۱ بعد از خون‌خواری) نشان‌دهندهٔ محدودهٔ نرمال شیب خط، R^2 و کارایی واکنش بود. نتایج تست qPCR نشان داد که تمامی سی پشهٔ بررسی‌شده آلودگی زیادی با اسپوروزوئیت‌ها داشتند (۲/۳۳±۱۸/۸۴). بنابراین، نتایج تست qPCR در تأیید نتایج میکروسکوپی نشان‌دهندهٔ میزان آلودگی زیاد اسپوروزوئیت‌ها در پشه‌ها بود. به‌علاوه، اسپوروزوئیت‌ها قابلیت زیادی در آلودگی میزبان بعدی داشتند (قابلیت آلوده‌سازی ۱۰۰ درصد) که نشان‌دهندهٔ موفقیت مدل آزمایشگاهی *پلاسمودیوم برگئی*-موش بالب سی-*آنوفل استفنسی* در مطالعهٔ 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 حداکثر می‌رسد. این یافته، که تاکنون در هیچ مطالعه‌ای گزارش نشده است، می‌تواند در بهینه‌سازی زمان‌بندی مطالعات انتقال انگل و طراحی استراتژی‌های مسدودکنندهٔ انتقال استفاده شود. بنابراین، مطالعهٔ 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

به‌درستی در بدن پشه ایجاد شود و تا مرحلهٔ انتهایی تکاملی انگل (مرحلهٔ آلودگی غدد بزاقی پشه) باقی بماند، باید جونده‌ای 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 تاژک‌دارشدن گامتوسیت نر و بلوغ آن است) در نمونهٔ جمع‌آوری‌شده از موش آلوده در روز خون‌خواری است. نتایج این مطالعه نشان داد که بهترین حالت در توسعهٔ 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 مرحلهٔ انتهایی تکاملی (مرحلهٔ آلودگی غدد بزاقی پشه) نقش مهمی دارد؛ زیرا زمانی که انگل بتواند گلوگاه‌های مهم تکاملی را در بدن پشهٔ ناقل طی کند، به احتمال زیاد سیکل تکاملی خود را تا مرحلهٔ 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 مرحلهٔ 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 توسعهٔ مدل آزمایشگاهی برای مطالعهٔ 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، ۱۶].

نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر نوعی مدل آزمایشگاهی موفق *پلاسمودیوم برگئی*-موش بالب سی-*آنوفل استفنسی* توسعه یافت. فاکتورهای مختلفی در موفقیت‌آمیزبودن مدل آزمایشگاهی فوق و تکمیل سیکل زندگی انگل تا مرحلهٔ غدد بزاقی در پشهٔ 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 نشان‌دهندهٔ آلودگی زیاد پشه‌ها با اسپوروزوئیت‌های انگل *پلاسمودیوم برگئی* بود. از این مدل می‌توان برای ارزیابی استراتژی‌های مسدودکنندهٔ انتقال یا بررسی برهم‌کنش انگل-پشهٔ آنوفل در مطالعات بعدی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از تمام افرادی که در اجرای این پروژه کمک کردند و مشاورهٔ 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 شمارهٔ ۱۳۱۹) و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (طرح پژوهشی ۴۰۱۳۸۷۰) انجام شده است. کمیتهٔ اخلاق انستیتو پاستور ایران (IR.PII.AEC.1401.009) این پروژه را تأیید کرده است. مقالهٔ فوق مستخرج از پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد است.

تضاد منافع

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

REFERENCES

1. World Health Organization. World malaria report 2025. Geneva: World Health Organization; 2025. [Link]
2. World Health Organization. Zeroing in on malaria elimination: final report of the E-2020 initiative. Geneva: World Health Organization; 2021. [Link]
3. 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]
4. 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]
5. 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]
6. Frischknecht F, Matuschewski K. Plasmodium sporozoite biology. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7(5):a025478. [DOI: 10.1101/cshperspect.a025478]
7. Bannister L, Hopkins J, Fowler R, Krishna S, Mitchell G. A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. Parasitol

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

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]

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]