

کارایی روش مولکولی در تشخیص ذخایر انگلی بدون علامت مالاریا در راستای اجرای برنامه حذف مالاریا در استان هرمزگان

حبیب اله ترکی^۱، زینب حسینی^۲، مریم سارانی^۱، ایمان قاسم‌زاده^۳، امین قنبر نژاد^۴، نازنین پورنصراله سرایی^۵، گلنوم رشید^{۱*}

۱. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.

0000-0002-4888-7144 ORCID

۲. گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۳. مرکز تحقیقات مراقبت اچ‌آی‌وی و عفونت‌های آمیزشی، مرکز همکار سازمان جهانی بهداشت، پژوهشکده آینده‌پژوهی در سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۴. گروه بهداشت عمومی، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی در ارتقاء سلامت، پژوهشکده سلامت هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۵. مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، پژوهشکده سلامت هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.

چکیده

هدف: برنامه حذف مالاریا با حمایت فنی سازمان بهداشت جهانی از سال ۱۳۸۹ در ایران آغاز شده است. به منظور دستیابی به حذف مالاریا، بایستی همه موارد مثبت به خصوص موارد بدون علامت و کم انگل تشخیص داده شده و به موقع درمان شوند، هدف اصلی این مطالعه تعیین کارایی روش مولکولی در تشخیص ذخایر انگلی بدون علامت مالاریا در راستای اجرا موفق برنامه حذف مالاریا در ایران است.

روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، ۲۱۰ نمونه به طور تصادفی از ساکنین مناطق پرخطر مالاریا استان هرمزگان جمع‌آوری شد. میزان عفونت بدون علامت پلاسمودیوم با استفاده از تکنیک‌های میکروسکوپی، Rapid Diagnostic Test و Nested-PCR (با استفاده از 18srRNA) تعیین گردید.

نتایج: با توجه به نتایج روش‌های میکروسکوپی و RDT هیچ مورد بدون علامتی در بین افراد مورد مطالعه مشاهده نشد اما با استفاده از روش مولکولی سه مورد مثبت (۱/۴ درصد) تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که حساسیت روش‌های مولکولی در تشخیص ذخایر انگلی بدون علامت بیشتر از سایر روش‌های تشخیصی مالاریا است و Nested-PCR تکنیک مناسبی برای تشخیص موارد بدون علامت مالاریا است، لذا استفاده از روش حساس مولکولی هم‌زمان با روش‌های میکروسکوپی و RDT به منظور تشخیص ذخایر انگلی بدون علامت مالاریا لازم و ضروری است.

کلیدواژه‌ها: مالاریا، تشخیص، ذخایر انگلی.

نوع مقاله: پژوهشی

دریافت مقاله: ۹۸/۱۱/۰۳ پذیرش مقاله: ۹۸/۰۸/۲۶

ارجاع: ترکی حبیب اله، حسینی زینب، سارانی مریم، قاسم‌زاده ایمان، قنبر نژاد امین، نازنین پورنصراله سرایی، رشید گلنوم. کارایی روش مولکولی در تشخیص ذخایر انگلی بدون علامت مالاریا در راستای اجرای برنامه حذف مالاریا در استان هرمزگان. طب پیشگیری. ۱۳۹۸؛ ۲۶(۲): ۳۴-۴۲.

مقدمه

مالاریا مهم‌ترین بیماری عفونی خونی و یکی از هشت بیماری گرمسیری مطرح‌شده در برنامه‌های سازمان بهداشت جهانی است (۱). علیرغم کاهش موارد مالاریا طی چند دهه، این بیماری معضل مهم بهداشتی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا است (۲،۳). بیش از ۴۰ درصد جمعیت جهان را تهدید می‌کند، ۹۱ کشور در دنیا درگیر مالاریا هستند (۴). طبق

آمار ارائه‌شده سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۷، ۲۱۹ میلیون نفر را مبتلا و ۴۳۵ هزار مرگ گزارش شده است (۵). در ایران بیماری مالاریا از دیرباز از مشکلات مهم بهداشتی و درمانی بوده و موجب زیان‌های اقتصادی و اجتماعی فراوانی شده است (۶-۸).

تأثیر مالاریا بر بهداشت عمومی و مؤلفه‌های ارتقاء سلامت باعث شده است که این بیماری در کانون توجه سازمان‌های

نویسنده مسئول: گلنوم رشید، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

0000000179210788 :Orcid

پست الکترونیکی: golirashid3@gmail.com

تلفن: ۹۸ ۷۶۳۳۳۳۶۲۰۲+

بدون علامت و موارد کم انگل می‌باشد و همچنین حساسیت بیشتری نسبت به روش‌های قبلی دارد، امری ضروری است (۳،۱۶،۱۷).

هدف اصلی این مطالعه استفاده از روش‌های مولکولی Nested-PCR، میکروسکوپی و RDT به منظور کشف نخایر انگلی بدون علامت مالاریا در شهرستان بندرعباس است. نتایج حاصل از این پژوهش ضمن فراهم آوردن اطلاعات پایه‌ای از وضعیت مالاریای بدون علامت، کمک زیادی به اجرای موفق برنامه حذف مالاریا در استان هرمزگان خواهد کرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی-تحلیلی به صورت مقطعی در شهرستان بندرعباس به منظور بررسی کارایی روش مولکولی در تشخیص موارد بدون علامت و کم انگل مالاریا انجام گرفت، جامعه آماری شامل ساکنین بومی در بخش‌هایی از شهرستان بندرعباس که سابقه انتقال مالاریا وجود داشته است همچنین اتباع بیگانه ساکن در شهرستان بندرعباس است.

در این مطالعه تعداد نمونه مطابق با فرمول کوکران محاسبه گردید و به منظور افزایش دقت حجم نمونه ۲۱۰ نفر تعیین شد که به صورت تصادفی از سطح شهرستان بندرعباس انتخاب شدند.

$$n = \frac{z^2 pq}{d^2} = \frac{(1.96)^2 \times (0.15) \times (0.85)}{(0.05)^2} \approx 196$$

n= حجم نمونه

Z= مقدار متغیر نرمال با سطح اطمینان ۹۵ درصد

p= احتمال موفقیت

q= احتمال شکست

d= دقت مطالعه

شهرستان بندرعباس در شمال تنگه هرمز قرار دارد. وسعت آن ۲۷۳۱۶ کیلومتر مربع است به استناد سرشماری سال ۱۳۹۵ شهر بندرعباس ۶۸۰۳۶۶ نفر جمعیت دارد (شکل ۱). برای انجام طرح با هماهنگی مرکز بهداشت استان هرمزگان، همچنین بر اساس اهداف مطالعه و بررسی خصوصیات جمعیتی و

بین‌المللی قرارگرفته و در نهایت برنامه‌ریزی جامع برای کنترل، حذف و ریشه‌کنی مالاریا را تصویب کنند (۴). به دنبال اجرای دقیق برنامه‌ی کنترل مالاریا و کاهش معنی‌دار موارد مثبت، برنامه حذف مالاریا با حمایت فنی سازمان بهداشت جهانی از سال ۱۳۸۹ در ایران آغاز شده است و در حال حاضر برنامه حذف مالاریا در ایران، در حال اجرا است (۹).

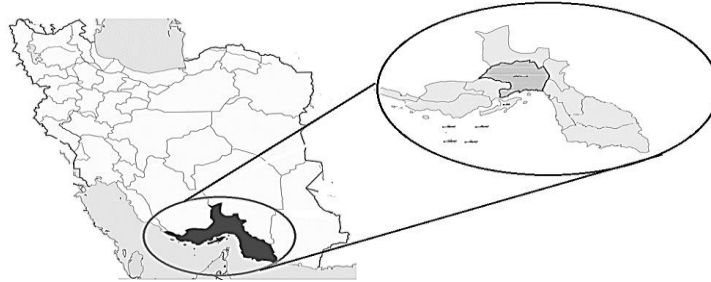
حذف بیماری مالاریا از اهداف مشترک سازمان جهانی بهداشت و نظام سلامت در ایران است (۱۰). هدف نهایی برنامه حذف مالاریا قطع انتقال محلی مالاریا است، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های برنامه حذف مالاریا، موارد کم انگل و بدون علامت است که به روش‌های روتین تشخیص مالاریا (میکروسکوپی و RDT) قابل‌شناسایی نیستند و به‌عنوان نخایر انگلی بدون علامت در جامعه عمل می‌کنند (۱۱،۱۲). مطالعات فراوان در کشورهای مختلف نشان داده‌اند که افراد بدون علامت، حامل گامتوسیت بوده و به‌عنوان منابع آلوده‌کننده مداوم پشه آنوفل و برقراری چرخه انتقال بیماری می‌باشند، لذا شناسایی و درمان این افراد در راستای اجرای موفق برنامه‌های حذف مالاریا بسیار مهم و حیاتی هست (۲،۱۳).

اولین گام در برنامه‌ریزی جهت کنترل و حذف بیماری مالاریا، شناسایی تمامی موارد مثبت و درمان به‌موقع آن به‌خصوص موارد کم انگل و بدون علامت است که ضرورت آن انتخاب یک روش مناسب و کارآمد تشخیصی است (۳،۱۲).

مطالعه میکروسکوپی گسترش رنگ‌آمیزی شده خون محیطی به‌عنوان روش استاندارد برای تشخیص مالاریا است، اما این روش اگرچه ساده، اختصاصی و کم‌هزینه می‌باشد، اما در تشخیص موارد کم انگل، عفونت توأم و نخایر انگلی بدون علامت، به‌اندازه کافی حساس و مؤثر نمی‌باشد (۳). در سال‌های اخیر روش‌های سریع از جمله Dipstick در تشخیص مالاریا استفاده شده است که تحقیقات نشان داده شناسایی موارد بدون علامت و کم انگل با کمک روش RDT به‌سادگی امکان‌پذیر نمی‌باشد (۱۴،۱۵)، لذا برای تشخیص نخایر انگلی بدون علامت، استفاده از روشی با حساسیت و ویژگی بالا نظیر تکنیک‌های مولکولی که ابزاری قدرتمند و بسیار مفید برای تشخیص عاملین

پرسشگر اطلاعات دموگرافیک افراد شامل نام و نام خانوادگی، سن و جنس، شغل، سابقه ابتلا و سابقه سفر، در فرم مخصوص ثبت گردید.

اکولوژی، شهر بندرعباس به عنوان محل نمونه‌گیری انتخاب شد. در ابتدا توضیح کامل در مورد طرح و مراحل انجام آن داده شد و به منظور تکمیل پرسش نامه، رضایت آگاهانه کلیه افراد قبل از شرکت در مطالعه، ضمن تشریح روند کامل تحقیق توسط



شکل ۱- نقشه منطقه مورد مطالعه، استان هرمزگان، شهرستان بندرعباس

سلولز می‌باشد. آنتی‌ژن‌های هدف برای pLDH RDTs, HRP-2 و آلدولاز پلاسمودیوم هستند (۱۹). یک قطره کوچک و منفرد از خون را با استفاده از پیپت یک‌بارمصرف برداشته و در حفره مخصوص نمونه، روی نوار تست قرار می‌دهیم. سپس دو قطره بافر موردنظر را در حفره مخصوص بافر ریخته و نوار را در یک سطح صاف قرار می‌دهیم. بعد از ۲۰ دقیقه نتیجه را گزارش می‌کنیم کیت مورد نظر دارای سه باند بوده که باند اول برای کنترل و دو باند دیگر در صورتی‌رنگی شدن نشان‌دهنده وجود انگل است. تغییر رنگ باند کنترل نشان‌دهنده اعتبار تست می‌باشد.

پس از استخراج DNA انگل با استفاده از روش مولکولی Nested PCR که حساسیت بالای در تشخیص موارد کم انگل و بدون علامت دارد، در مرحله اول تشخیص جنس و در مرحله دوم تشخیص گونه‌های پلاسمودیوم‌های ویواکس و فالسیپاروم در نمونه‌های مورد مطالعه صورت گرفت (۲۰).

استخراج DNA به‌منظور جدا کردن و حذف چربی‌ها، پروتئین‌ها و املاح اضافه از نمونه می‌باشد. در این مطالعه جهت دستیابی به DNA با درجه خلوص بالا و عاری از هرگونه ممانعت کننده در واکنش PCR از کیت Genomic DNA (Blood/Culture Cell Mini kit) ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما ایران استفاده گردید.

سپس افراد از لحاظ وجود و یا عدم وجود علائم کلینیکی (اختصاصی یا غیراختصاصی) ارزیابی و نتایج در فرم‌های مربوطه ثبت گردید، از هر شرکت‌کننده ۲ سی‌سی خون گرفته شد و در لوله‌های استریل حاوی ۵۰ میکرولیتر EDTA نیم مولار جهت انجام تست‌های PCR جمع‌آوری شد.

گسترش نازک و ضخیم خون، جهت تشخیص میکروسکوپی مالاریا تهیه و به‌طور هم‌زمان تست تشخیص سریع (RDT) با استفاده از کیت (Premier Medical Corporation Ltd. Mumbai, India).

گسترش تهیه شده خون محیطی به آزمایشگاه دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس منتقل شد و بر مبنای دستورالعمل استاندارد سازمان جهانی بهداشت با متانول فیکس و به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شد (۱۸) و سپس بررسی میکروسکوپی انجام گرفت.

در این پژوهش به دلیل مطالعه موارد کم انگل، حدوداً ۴۵ دقیقه گسترش نازک و ۲۰۰ میدان در گسترش ضخیم موردبررسی قرار گرفت.

تمامی افراد شرکت‌کننده در مطالعه، هم‌زمان با نمونه‌گیری با استفاده از کیت RDT موردبررسی قرار گرفتند. اساس این روش بر پایه ایمنوکروماتوگرافی و تهیه و ثابت کردن منوکلونال آنتی‌بادی علیه یکی از آنتی‌ژن‌های مالاریا بر روی نوارهای نیترو

کنترل مثبت، DNA های استخراج شده از خون افراد مبتلابه مالاریا بود که مثبت بودن آن به روش میکروسکوپی به اثبات رسیده بود. کنترل منفی، DNA های استخراج شده از خون افراد سالمی بود که قبلاً به مالاریا مبتلا نشده بودند و سابقه سفر به مناطق آندمیک مالاریا را نیز نداشتند.

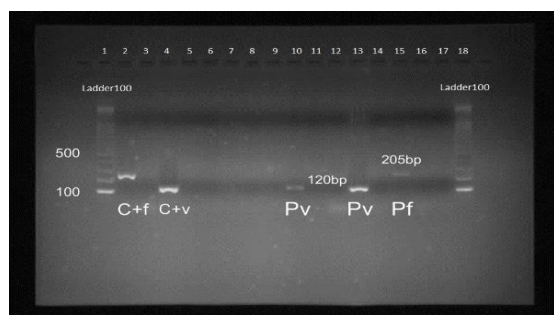
یافته‌ها

تعداد افراد شرکت‌کننده در مطالعه ۲۱۰ نفر بودند که ۱۷/۶ درصد افراد تحت مطالعه مؤنث و ۸۲/۴ درصد مذکر بودند. دامنه سنی افراد بین ۴ تا ۶۵ سال و میانگین سن آن‌ها ۲۴/۰۴۷ بود (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی افراد بدون علامت مالاریا به تفکیک سن، جنس

متغیر	گروه سنی (سال)			جنس	
گروه	<15	15-30	>45	مذکر	مؤنث
تعداد	25	144	30	173	37
درصد %	11/9	68/6	14/5	82/4	17/6
کل	210 (100%)				

به‌منظور اطمینان از صحت نتایج مولکولی در هر سری آزمایش همراه با نمونه‌ها از کنترل مثبت و منفی نیز استفاده شد (شکل ۲).



شکل ۲- ژل الکتروفورز محصولات NESTED-PCR (ستون ۱ و ۱۸ Ladder، ستون‌های ۲ و ۴ به ترتیب کنترل مثبت پلاسمودیوم‌های فالسیپاروم و ویواکس، ستون‌های ۱۰ و ۱۳ نمونه‌های مثبت پلاسمودیوم ویواکس، ستون ۱۵ نمونه مثبت پلاسمودیوم فالسیپاروم)

بحث و نتیجه‌گیری

بیماریابی، تشخیص تمامی موارد مثبت و درمان به‌موقع از استراتژی‌های مهم برنامه حذف مالاریا است، در این راستا

در Nested PCR-1 پس از افزودن ۲ میکرولیتر DNA الگو مخصوص هر نمونه به سایر اجزای واکنش و همچنین با استفاده از پرایمر ویژه تعیین جنس پلاسمودیوم (1200 bp) مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر تهیه و در دستگاه PCR (ترموسایکلر) قرار گرفته و با دادن برنامه مناسب به دستگاه، PCR انجام گرفت.

در Nested PCR-2، محصول مرحله اول به عنوان DNA الگو و از پرایمر اختصاصی گونه برای تعیین گونه‌های پلاسمودیوم ویواکس (120 bp) و پلاسمودیوم فالسیپاروم (205 bp) مورد استفاده قرار گرفت. هر مرحله ۲۵-۳۰ سیکل تکرار شده و دمای Annealing برای هر دو مرحله ۷۲ درجه سانتیگراد تعیین شد.

در نهایت محصول مرحله دوم PCR، در ژل آگارز ۲ درصد و در حضور شاخص مولکولی به اندازه ۱۰۰ جفت باز مورد بررسی قرار گرفت و و از ژل نیز توسط سیستم عکس‌برداری دیجیتالی برای گزارش نهایی نتایج عکس گرفته شد.

پس از بررسی دقیق تمامی نمونه‌ها، با استفاده از روش میکروسکوپی و RDT هیچ مورد مثبتی یافت نشد، اما به روش مولکولی، سه مورد مثبت تشخیص داده شد؛ که دو مورد پلاسمودیوم ویواکس و یک مورد پلاسمودیوم فالسیپاروم بود (جدول ۳ و ۲).

جدول ۲- جدول فراوانی موارد مثبت مالاریای بدون علامت برحسب روش تشخیص

روش	میکروسکوپی		RDT		مولکولی	
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
تعداد	۰	۲۱۰	۰	۲۱۰	۳	۲۰۷
درصد	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۱/۴	۹۸/۶
کل	210 (100%)					

جدول ۳- جدول فراوانی موارد مثبت مالاریای بدون علامت برحسب گونه

وضعیت	پلاسمودیوم ویواکس		پلاسمودیوم فالسیپاروم	
	مثبت	منفی	مثبت	منفی
تعداد	۲	۲۰۸	۱	۲۰۹
درصد	۰/۹۵	۹۹/۰۵	۰/۴۷	۹۹/۵۳
کل	210 (100%)			

ضرورت استفاده از روش مولکولی در تشخیص موارد کم انگل و بدون علامت بود. موریرا و همکاران در سال ۲۰۱۵ در یک مطالعه مروری باهدف بررسی نظام‌مند عفونت کم انگل پلاسمودیوم ویواکس انجام شد عنوان کردند که شیوع عفونت پلاسمودیوم ویواکس اندازه‌گیری شده به وسیله PCR به‌طور مشخص بالاتر از شیوع آن به روش میکروسکوپی می‌باشد. میانگین شیوع عفونت تشخیص داده‌شده به روش میکروسکوپی درصد کمتر از شیوع آن توسط PCR است. نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعه ما هم‌خوانی دارد (۲۶).

مطالعات متعددی که در امریکای جنوبی، افریقا و آسیا به‌منظور کشف نخایر انگلی بدون علامت انجام‌شده تأکید بر استفاده از روش مولکولی دارند که با نتایج مطالعه اخیر مطابقت کامل دارد (۲۴، ۲۷، ۲۸). در بررسی‌های به‌عمل‌آمده هیچ مطالعه‌ای یافت نشد که بیانگر حساسیت کمتر روش مولکولی در تشخیص مالاریا نسبت به سایر روش‌های روتین تشخیص باشد. نتایج مطالعات ذکرشده نشان دادند که حساسیت روش‌های مولکولی در تشخیص نخایر انگلی بدون علامت بیشتر از سایر روش‌های تشخیصی مالاریا است و Nested-PCR تکنیک مناسبی برای تشخیص موارد بدون علامت مالاریا است (۳، ۲۲) که در پژوهش ما نیز هم‌زمان از روش‌های میکروسکوپی، RDT و مولکولی Nested-PCR جهت تشخیص مالاریای بدون علامت استفاده گردید.

نقطه قوت مطالعه استفاده از تکنیک مولکولی در کنار سایر روش‌های روتین تشخیص مالاریا است و از محدودیت‌های مطالعه حجم نمونه نسبتاً کم می‌باشد. در راستای اجرای موفق برنامه حذف مالاریا در ایران، تشخیص نخایر انگلی بدون علامت در مناطق اندمیک، ضرورتی حیاتی است و استفاده از روش کارآمد و مؤثر مولکولی Nested-PCR که یک روش حساس و انتخابی در تشخیص موارد کم انگل و بدون علامت مالاریا است، در کنار روش‌های روتین تشخیصی (میکروسکوپی و RDT)، اجتناب‌ناپذیر است. پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های در راستای پایش حضور و فراوانی آلودگی‌های بدون علامت مالاریا در ساکنین بومی و اتباع بیگانه در سایر

مهم‌ترین چالش، تشخیص موارد بدون علامت و کم انگل مالاریا است (۱۰، ۱۳)، این افراد به دلیل عدم بروز علائم کلینیکی و پایین بودن میزان انگل، با استفاده از روش‌های روتین تشخیص مالاریا قابل‌شناسایی نیستند (۲، ۲۱) در این مطالعه به‌منظور افزایش دقت و صحت نتایج، هم‌زمان از سه روش میکروسکوپی، سرولوژی و مولکولی استفاده گردید، روش میکروسکوپی به‌عنوان روش استاندارد تشخیص مالاریا، روش سرولوژی RDT به‌عنوان یک روش تکمیلی و کمک‌کننده و تکنیک مولکولی Nested-PCR به‌عنوان یک روش با حساسیت و اختصاصیت بالا که می‌تواند موارد کم انگل را تشخیص دهد (۱۴، ۱۶، ۲۲). نتایج تمامی نمونه‌ها با استفاده از روش‌های میکروسکوپی و RDT منفی بود و هیچ مورد مثبتی با استفاده از این دو روش گزارش نشد، اما با استفاده از روش مولکولی سه مورد مثبت تشخیص داده شد که نشان‌دهنده کارآیی و اهمیت استفاده از روش مولکولی در تشخیص نخایر انگلی بدون علامت است.

حسن‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۷ در یک مطالعه مروری مالاریای بدون علامت را به‌عنوان چالش بزرگ برنامه حذف مالاریای موردبررسی قرار دادند و استفاده از تکنیک مولکولی در تشخیص آن را ضروری دانستند، میرشکاری و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای در مورد وضعیت مالاریای بدون علامت در جنوب استان کرمان انجام دادند، همچنین مطالعه ترکی و همکاران که در سال ۲۰۱۵ در میناب انجام شد و استفاده از تکنیک مولکولی در تشخیص موارد بدون علامت را مورد تأکید قرار دادند که نتایج این دو مطالعه با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۲، ۳، ۱۰).

مطالعه محمد عبدال نعیم و همکاران که در سال ۲۰۱۸ در پاکستان انجام شد (۲۳). همچنین مطالعه‌ای که توسط بانوم و همکاران در سال ۲۰۱۶ در منطقه مرزی تایلند و میانمار برای بررسی مالاریای بدون علامت انجام گرفت (۲۴) و مطالعه‌ای مارادیا و همکاران که در سال ۲۰۱۶ باهدف بررسی عفونت بدون علامت مالاریا در مناطق اندمیک هندوراس انجام شد (۲۵) با نتایج پژوهش ما مطابقت دارد، نتایج مطالعه آن‌ها بیانگر

حبیب اله ترکی (نویسنده اول) طراحی مطالعه و نگارش مقاله، تشخیص نمونه ها، بررسی و تایید نسخه اصلی مقاله ۲۵ درصد. زینب حسینی (نویسنده دوم) گردآوری داده ها، مطالعه و تایید نسخه اصلی مقاله ۱۰ درصد. مریم سارانی (نویسنده سوم) نمونه گیری و همکاری در گردآوری داده ها، مطالعه و تایید نسخه اصلی مقاله ۱۰ درصد. ایمان قاسم‌زاده (نویسنده چهارم) همکاری در طراحی مطالعه، همکاری در گردآوری نمونه ها و تشخیص، مطالعه و تایید نسخه اصلی مقاله ۱۰ درصد. امین قنبرزاد (نویسنده پنجم) تفسیر و تحلیل داده ها، مطالعه و تایید نسخه اصلی مقاله ۱۰ درصد. نازنین پورنصراله سرایی (نویسنده ششم) همکاری در نمونه گیری و تشخیص، آماده سازی نمونه ها، مطالعه و تایید نسخه اصلی مقاله ۱۰ درصد. گلثوم رشید (نویسنده هفتم و مسئول) همکاری در طراحی مطالعه مشارکت در تشخیص نمونه ها، و بازبینی و اصلاح نهایی مقاله، بررسی و تایید نسخه اصلی مقاله ۲۵ درصد.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان انجام شده است.

مناطق پرخطر استان هرمزگان که دارای ظرفیت انتقال مالاریا هستند، با تأکید استفاده از روش مولکولی در کنار روش‌های روتین تشخیص مالاریا، به صورت دوره‌ای انجام گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان بابت حمایت مالی طرح، همکاری پرسنل و کارشناس‌های مالاریای معاونت بهداشتی در انجام مراحل پژوهش و افرادی که در طرح مشارکت کردند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب جلسه شورای پژوهشی ۱۳۹۶ و جلسه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان با کد اخلاق HUMS.REC.1396.40 است.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

سهم نویسندگان

References

1. Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet Infect Dis.* 2018; 391(10130):1608-21. Doi: 10.1016/S0140-6736(18)30324-6
2. Amirshakeri MB, Nateghpour M, Raeisi A, Motevalli Haghi A, Farivar L, Edrissian G. Determination of asymptomatic Malaria among afghani and pakistani immigrants and native population in south of Kerman province, Iran *J Parasitol.* 2016; 11(2):247-52. PMID: 28096860
3. Turki H, Raeisi A, Malekzadeh K, Ghanbarnejad A, Zoghi S, Yeryan M, et al. Efficiency of nested-PCR in detecting asymptomatic cases toward Malaria elimination program in an endemic area of Iran. *Iran J Parasitol.* 2015; 10(1):39-45. PMID: 25904944
4. Tanner M, Greenwood B, Whitty CJ, Ansah EK, Price RN, Dondorp AM, et al. Malaria eradication and elimination: Views on how to translate a vision into reality. *BMC Med.* 2015;13:167. Doi: 10.1186/s12916-015-0384-6
5. World Health Organization. World Malaria report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Available at: <https://www.who.int/Malaria/publications/world-Malaria-report-2018/en/>
6. Azizi MH, Bahadori M. Brief historical perspectives of Malaria in Iran. *Arch Iran Med.* 2013; 16(2):131. PMID: 23360639
7. Edrissian G. Malaria in Iran: Past and present situation. *IJP.* 2006; 1(1):1-14.

8. Norouzinejad F, Ghaffari F, Raeisi A. Epidemiological status of Malaria in Iran, 2011–2014. *Asian Pac J Trop Med*. 2016; 9(11):1055-61. Doi: 10.1016/j.apjtm.2016.09.007
9. Turki H, Zoghi S, Mehrizi AA, Zakeri S, Raeisi A, Khazan H, et al. Absence of asymptomatic Malaria infection in endemic area of Bbshagard district, Hormozgan province, Iran. *IJP*. 2012; 7(1):36-44. PMID: 23133470
10. Hassanpour G, Mohebbali M, Zeraati H, Raeisi A, Keshavarz H. Asymptomatic Malaria and its challenges in the Malaria elimination program in Iran: A systematic review. *J Arthropod Borne Dis*. 2017 ;11(2):172-81. PMID: 29062842
11. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: Asymptomatic parasitemia and Malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect*. 2013; 11(6):623-39. Doi: 10.1586/eri.13.45
12. Hemami MR, Sari AA, Raeisi A, Vatandoost H, Majdzadeh R. Malaria elimination in Iran, importance and challenges. *IJPM*. 2013; 4(1):88. PMID: 23413116
13. Liu Y, Sturrock HJW, Yang H, Gosling RD, Cao J. The challenge of imported Malaria to eliminating countries. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(2):141. Doi: 10.1016/S1473-3099(17)30006-3
14. Visser T, Daily J, Hotte N, Dolkart C, Cunningham J, Yadav P. Rapid diagnostic tests for Malaria. *Bull World Health Organ*. 2015; 93(12):862-6. Doi: 10.2471/BLT.14.151167
15. Nateghpour M, Turki H, Keshavarz H, Edrissian GH, Mohebbali M, Foroushani AR. A parasitological and serological study in Malaria suspected patients in Hormozgan province, southeastern Iran. *IRCMJ*. 2010; 12(3):242.
16. Zimmerman PA, Howes RE. Malaria diagnosis for Malaria elimination. *Curr Opin Infect Dis* 2015;28(5):446-54. Doi: 10.1097/QCO.0000000000000191
17. Ebrahimzadeh A, Dalir SN, Mirahmadi H, Mehravaran A, Khorashad AS, 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 J Microbiol*. 2017; 10(10): e58254. Doi: 10.5812/jjm.58254.
18. World Health Organization. Basic Malaria microscopy. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2010. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44208/9789241547826_eng.pdf
19. World Health Organization. Malaria rapid diagnostic tests Geneva: World Health Organization; 2017. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255038/9789241512275-eng.pdf>
20. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaitong S, Brown KN. Identification of the four human Malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasite*. 1993; 58(2):283-92. Doi: 10.1016/0166-6851(93)90050-8
21. Turki H, Rashid G, Shekari M, Raeisi A, Sharifi-Sarasiabi K. Malaria elimination program: Absence of asymptomatic Malaria and low parasitic in endemic area of Rudan district, Hormozgan Province, Iran. *HMJ*. 2017; 21(4):225-31.
22. Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. Molecular Malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Cl Lab Sci*. 2016;53(2):87-105. Doi: 10.3109/10408363.2015.1084991
23. Naeem MA, Ahmed S, Khan SA. Detection of asymptomatic carriers of Malaria in Kohat district of Pakistan. *Malar J*. 2018; 17(1):44. Doi: 10.1186/s12936-018-2191-y
24. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Jain A, Taghavian O, et al. Common asymptomatic and submicroscopic Malaria infections in Western Thailand revealed in longitudinal molecular and serological studies: A challenge to Malaria elimination. *Malar J*. 2016; 15(1):333. Doi: 10.1186/s12936-016-1393-4
25. Maradiaga A, García JS, Mejía-Torres RE, Escobar L, Matamoros J, Enríquez L, et al. Asymptomatic Malaria infections in an endemic city of Honduras. *Hum Parasit Dis*. 2016; 2016(8):37-41. Doi: 10.4137/HPD.s40183

26. Moreira CM, Abo-Shehada M, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of submicroscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malar J.* 2015; 14(1):360. Doi: 10.1186/s12936-015-0884-z
27. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MV. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in Malaria control and elimination. *Malar J.* 2017; 16(1):273. Doi: 10.1186/s12936-017-1925-6
28. De Andrade ALS, Martelli CM, Oliveira RM, Arias JR, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic Malaria in gold mining areas in Brazil. *Clin Infect Dis.* 1995; 20(2):475. Doi: 10.1093/clinids/20.2.475

Efficacy of molecular method in detecting asymptomatic parasitic reservoirs of Malaria

Habibollah Turki¹ Zeinab Hoseini² Maryam Sarani¹ Iman Ghasemzadeh³ Amin Ghanbarnejad⁴
Nazanin Pournasrollah⁵ Golsoom Rashid^{1*}

1. Infectious and Tropical Diseases Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran. ORCID: 0000-0002-4888-7144
2. Department of Medical Parasitology and Micology, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.
3. HIV/STI Surveillance Research Center, and WHO Collaborating Center for HIV Surveillance, Institute for Futures Studies in Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
4. Department of Public Health, Social Determinants in Health Promotion Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.
5. Molecular Medicine Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

ABSTRACT

Introduction: Malaria Elimination Program Has Launched with the Technical Support from The World Health Organization Since 2007 in Iran. In Order to Achieve The Elimination of Malaria, All Positive Cases Should Be Diagnosed and Treated Promptly, Especially Asymptomatic and Low Parasitic cases. This Study Was Conducted to Determine The Effectiveness of The Molecular Method in The Detection of Asymptomatic Malaria Cases towards the successful Malaria Elimination Program in Iran.

Methods: In This Descriptive-analytical Study, 210 Samples Were Randomly Collected from Residents of High Risk malarious Areas of Hormozgan Province. The Rate of Asymptomatic Plasmodium Infection Was Evaluated Using Microscopic, RDT, and Nested-PCR Techniques (using 18 ssrRNA).

Results: According to The Results, No Positive Asymptomatic Cases Were Observed with The Microscopic and RDT Methods, But by Using The Molecular Method, Three Positive Cases (1.4%) Were Detected.

Conclusion: The Results of This Study Showed That The sensitivity of molecular methods to detect asymptomatic parasitic reservoirs is higher than other diagnostic methods and Nested-PCR is a good technique for detecting asymptomatic cases of malaria, therefore Use of a Sensitive Molecular Techniques With Microscopic and RDT Methods Is Necessary for The Detection of Asymptomatic Malaria Cases.

Key Words: Malaria, Detection, Parasitic Reservoir.

Original Article

Received: 22 Feb 2019

Accepted: 17 Nov, 2019

Citation: H Turki, Hoseini Z, Sarani M, Ghasemzadeh I, Ghanbarnejad A, Pournasrollah N, Rashid G. Efficacy of molecular method in detecting asymptomatic parasitic reservoirs of Malaria .JPM. 2020; 6(2):34-42

Correspondence: Golsoom Rashid, MSC, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

Tel: +9833336202

Email: Golirashid3@gmail.com

ORCID: 0000000179210788