Archive of SID

تعیین مولکولی آنوفل فلوویاتیلیس کمپلکس در شهرستان چابهار، استان سیستان و بلوچستان

احمد مهرآوران [۱] دکتر محمدعلی عشاقی [۲] دکتر عادل ابراهیم‌زاده [۳] مظهر اقبال قریشی [۴] عبدالغفار حسن‌زهی [۴]

[۱] کارشناس ارشد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، [۳] دانشیار انگل‌شناسی، [٤] کارشناس میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان [۲] دانشیار گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مجله پزشکی هرمزگان سال پانزدهم شماره چهارم زمستان ۹۰ صفحات ۲۶۸-۲۶۰

چکیده

مقدمه: *در کشورهای ناحیه مدیترانه شرقی سازمان جهانی بهداشت، بیماریهای منتقله به وسیله ناقلین نظیر مالاریا، بخش عمده‌ای از بیماریهای واگیردار را به خود اختصاص می دهند. مالاریا در جنوب شرقی کشور از جمله شهرستان چابهار به صورت اندمیک وجود دارد و در هر سال موارد فراوان ابتلا افراد به این بیماری از این شهرستان گزارش می شود. امروزه به کمک روشهای مولکولی PCR هویت نمونه‌ها تا سطح گونه، جمعیت و حتی ژنوتیپ (هاپلوتایپ) بدست می‌آید. هدف از این مطالعه تعیین گونه های کمپلکس آنوفل فلوویاتیلیس در منطقه مالاریاخیز چابهار می‌باشد.*

روش کار: *در این مطالعه نمونه های An. fluviatilis با استفاده از روشهای صید کلی Total catch شلتر پیت Pit shelter و گزش شبانه انسانی و حیوانی صید شدند. جهت استخراج DNA نمونه ها از روش فنل کلروفرم استفاده شد و سپس این DNA در آزمایشات PCR مورد استفاده و سپس محصولات PCR دو بخش D_3 و ITS_2 تعیین توالی شدند. جهت تعیین گونه‌های مورد نظر، توالی های بدست آمده به کمک مقایسه با توالی نمونه های موجود در بانک جهانی ژن GenBank و نیز رسم درختهای فیلوژنی مورد بررسی قرار گرفتند.*

نتایج: *جهت تعیین ساختار ژنتیکی و شناسایی مولکولی نمونه‌ها لوکوس‌های D3 به طول ۳۷۶ bp و ITS2 به طول bp ٥١٤ به کمک PCR تکثیر شدند. مقایسه توالی های لوکوس های ITS2 با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن نشان داد که در منطقه چابهار فقط گونه T وجود دارد در حالی که مقایسه توالی‌های لوکوس D3 با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن نشان داد که علاوه بر گونه T گونه U کمپلکس آنوفل فلوویاتیلیس در شهرستان چابهار نیز وجود دارد.*

نتیجه‌گیری: *بر اساس مطالعات گذشته، گونه T تنها گونه شناخته شده کمپلکس آنوفل فلوویاتیلیس در کشور بود ولی با مطالعه صورت گرفته در شهرستان چابهار و وجود دو گونه T و U، پیشنهاد می‌شود که در هر منطقه مطالعات مستقل صورت گیرد. این امر می‌تواند کمک شایانی در برنامه‌های کنترل بیماری مالاریا انجام دهند.*

کلیدواژه‌ها: *مالاریا- PCR- ایران*

نویسنده مسئول:
دکتر محمدعلی عشاقی
گرو حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین –دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
تهران – ایران
تلفن: ۸۸۹٥٤۷۸۱ ۲۱ ۹۸+
پست الکترونیکی:
moshaghi@sina.tums.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۹/۳/۳ اصلاح نهایی: ۸۹/۹/۱۱ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۰/۷

مقدمه:

بیش از نیمی از ناقلین مهم مالاریا از گونه‌های کمپلکس می‌باشند. این گونه‌ها از نظر مورفولوژی کاملاً مشابه بوده ولی از نظراکولوژی، بیولوژی، آنتروپوفیلی، پتانسیل انتقال بیماری و مقاومت به حشره‌کشها با هم متفاوت هستند.

آنوفل فلوویاتیلیس *Anopheles fluviatilis* James 1902 (۱) به عنوان یکی از ناقلین اصلی مالاریا در ایران نقش مهمی در انتقال بیماری مالاریا در برخی مناطق اندمیک کشور دارد (۲). مطالعات صورت گرفته روی این گونه در ایران نشان می‌دهد که شاخص خونخواری از انسان از ۳/٤ تا ۲۸/٦٪ میزان اسپوروزئیت از صفر تا ۱۱٪ و مکانهای استراحت از اماکن داخلی (اندوفیل) تا خارجی (اگزوفیل) متفاوت بوده است (۲). در

www.SID.ir

Archive of SID

سایر کشورها این تفاوتها در مطالعات انجام شده بر روی این آنوفل نیز گزارش شده است (٦-٤). تحقیقات سیتوتاکسونومی کروموزوم های پلی تن این گونه در شبه قاره هند نشان داد که سه گونه آنوفل فلوویاتیلیس به نامهای S,T,U وجود دارد (٧). طی یک بررسی در سال ٢٠٠١ در هند با مطالعات ملکولی بخش internal transcribed spacer number II (ITS2) ژن رایبوزومال rDNA دو هاپلوتایپ یا ژنوتایپ متمایز مشاهده شد که چون اطلاعات کروموزومی از نمونه‌های مورد بررسی در اختیار نبود، آنها را Y و X نامیدند (٨). تحقیقات بعدی با مطالعات همزمان اطلاعات کروموزومی نشان داد که ٩٤٪ ژنوتایپ‌های X همان گونه S و ٩٠٪ ژنوتایپ های Y همان گونه T بودند (٩). در ایران با مطالعه ای که بر روی خصوصیات مولکولی جمعیت‌هایی از آنوفل فلوویاتیلیس صورت گرفت، مشخص شد که تمامی نمونه‌ها ١٠٠٪ مشابه گونه T (ژنوتایپ Y) هند هستند (٣). تحقیقاتی که امروزه جهت تفکیک گونه‌های آنوفل فلوویاتیلیس انجام می‌شود، از آزمایش PCR بخش سوم Domain 3 (D3) ژن rDNA علاوه بر ITS2 کمک گرفته شده است (١١). مطالعات دیگری که توسط Chen و همکارانش در بخش ITS2 روی پشه‌های آنوفل کشورهای چین، تایلند، ویتنام، هند، نپال، پاکستان و ایران صورت گرفت، نشان داد که بخش ITS2 دارای ٦ هاپلوتیپ می‌باشد که سه هاپلوتیپ T1, T2, Y مربوط به آنوفل فلوویاتیلیس T و سه هاپلوتیپ دیگر شامل V، X و U می‌باشند (٥).

هاپلوتیپ‌های فوق از نظر بسیاری از خصوصیات مانند میزان آنتروپوفیلی، اگزوفیلی و استعداد ناقلی با یکدیگر متفاوت هستند. مثلاً با مطالعه‌ای که بر روی آنوفل فلوویاتیلیس S و یا X در کشور هند انجام شد، نشان داد که این گونه بسیار انسان دوست بوده و ناقل اصلی مالاریا در نواحی تپه‌ای و کوهپایه‌ای می‌باشد (٤،١٤،١٥). در تحقیقات بعدی مشخص شد که گونه‌های T و U اغلب حیوان دوست و ناقل ضعیف و یا اصلاً ناقل بیماری مالاریا در هند نیستند (٤). در حالی که با مطالعاتی که در ایران، پاکستان و نپال صورت گرفت، نشان داد که آنوفل فلوویاتیلیس T یکی از ناقلین اصلی بیماری مالاریا در این کشورها می‌باشد (٣،٦). این تفاوتها مانند اختلافات اکولوژیک، بیولوژیک، پراکندگی جغرافیایی، آنتروپوفیلی، پتانسیل انتقال بیماری و مقاومت به حشره‌کشها از خصوصیات گونه‌های کمپلکس آنوفل می‌باشد. با توجه به اینکه شهرستان چابهار از کانونهای فعال بیماری مالاریا در استان سیستان و بلوچستان به شمار می‌آید و گونه آنوفل فلوویاتیلیس یکی از ناقلین مهم در این منطقه محسوب می‌شود، لذا تشخیص گونه‌های این کمپلکس اهمیت بسزایی در برنامه‌های کنترل مالاریا دارد.

روش کار:

این تحقیق در شهرستان چابهار استان سیستان و بلوچستان انجام گرفت. شهرستان چابهار به علت مجاورت با دریای عمان دارای آب و هوای گرم و مرطوب در فصل انتقال بیماری مالاریا است. جمع‌آوری نمونه‌ها از فروردین تا آذرماه از روستاهای پیرسهراب، دوبندان و باهوکلات که از روستاهای مالاریاخیز شهرستان چابهار هستند، صورت گرفت. پشه‌های بالغ به روشهای صید کلی (Total catch)، گزش شبانه انسانی و حیوانی و شلترپیت Pit shelter صید شدند. برای شناسایی پشه‌های بالغ از کلید تشخیص شاهگودیان (١٦) استفاده شد و سپس جهت آزمایشات مولکولی پشه‌های بالغ در دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج DNA نمونه‌ها از روش فنل - کلروفرم استفاده شد (١٧). در ادامه به کمک واکنشهای زنجیره‌ای زنجیره‌ای PCR از DNA تهیه شده جهت تکثیر بخش D3 (قسمتی از ناحیه 28S ژن rDNA) و نیز بخش ITS2 استفاده و سپس محصولات PCR دو بخش D3 و ITS2 تعیین توالی شدند. جهت PCR و تعیین توالی دو بخش فوق به ترتیب از پرایمرهای Litvaitis و همکاران و Beebe & Saul استفاده شد (١٨،١٩). محصول PCR تکثیر شده D3 علاوه بر ناحیه D3 ژن 28S شامل ناحیه بین D2 و D3 و نیز ناحیه بین D3 و D4 نیز می‌باشد (٤). برای آزمایشات PCR از دستورالعمل Chen و همکاران (٢٠٠٢) استفاده شد (٢٠). محصولات PCR روی ژل ١/٢٪ برای ITS2 و ١/٥٪ برای D3 الکتروفورز شدند. پس از رنگ‌آمیزی محصولات، PCR بوسیله اتیدیوم بروماید و مشاهده با نور ماوراء بنفش به کمک دستگاه تصویربرداری (Geldocumentary)، از محصولات تصویربرداری شد. از هر نمونه DNA مقدار ١٠٠-٥٠ میکرولیتر محصول PCR جهت تعیین توالی تهیه شد و جهت

www.SID.ir

Archive of SID

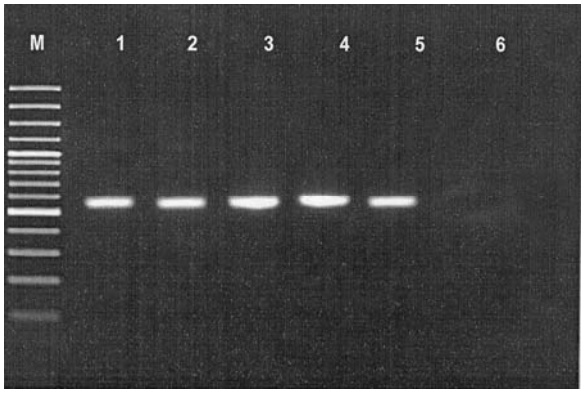
تعیین توالی (sequencing) به شرکت Seqlab کشور آلمان فرستاده شدند (Germany, Seqlab). جهت تعیین درستی توالی‌ها، تشخیص گونه‌ها و روابط فیلوژنی نمونه‌های مورد مطالعه و نمونه‌های موجود در بانک جهانی ژن (GenBank)، توالی‌های بدست آمده به کمک نرم‌افزار بلاست (Blast) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST موجود در Pubmed تست و مورد مقایسه با سایر توالی‌های موجود در GenBank قرار گرفتند.

برای چیدمان (Alignment) توالی‌های D3 و ITS2 از نرم‌افزار Clustal X (۲۱) کمک گرفته شد و سپس این توالی‌ها با همدیگر مقایسه شدند. توالی‌های حاصل از این مطالعه با شماره‌های دسترسی (Accession Numbers) برای بخش ITS2 و همچنین برای بخش D3 در بانک جهانی ژن GenBank ثبت شدند. همچنین جهت مطالعه فیلوژنی از روش Maximum parsimony method استفاده و درختهای فیلوژنی (کلادوگرام و فیلوگرام) به کمک نرم‌افزار Treeview رسم شدند.

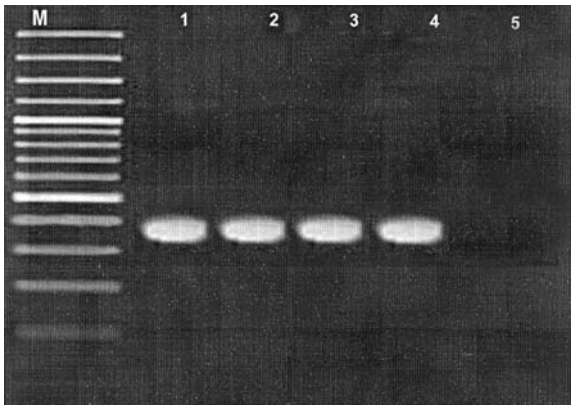
نتایج:

در این مطالعه از میان جمعیت آنوفل‌هایی که صید شده بودند، تعداد ۲۳ پشه آنوفل فلوویاتیلیس مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفتند. در این تحقیق جهت استخراج DNA نمونه‌ها از روش فنل – کلروفرم استفاده شد زیرا بهترین و مناسب‌ترین روش برای استخراج DNA آنوفل فلوویاتیلیس می‌باشد. از کل نمونه‌هایی که DNA خوب و مناسب و نیز محصولات PCR با باند قوی تولید می‌کردند، جهت مطالعه سکونسینگ و تعیین توالی دو بخش D3 و ITS2 استفاده شد. در این مطالعه طول باند محصولات PCR تولید شده، شامل 514bp برای بخش ITS2 و 376 bp برای بخش D3 بود (تصویر شماره ۱ و ۲).

با مقایسه توالی‌ها مشخص شد که محصول PCR بخش ITS2 شامل 112bp از ژن 5.8S، 374pb تمام بخش ITS2 و 28bp از ژن 28S، ژن rDNA می‌باشد و همچنین مقایسه توالی‌ها نشان داد که باند تولید شده بخش D3 معادل 376 bp بود که شامل 13 bp از ناحیه بین D2 و D3، تمام ناحیه D3 بطول 168 bp و حدود 195 bp از ناحیه بین D3 و D4 ژن 28S از ژن rDNA می‌باشد.



تصویر شماره ۱– طول باند 514bp در جمعیت‌های مختلف آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان چابهار حاصل از PCR بخش ITS2 ژن rDNA (ITS2-rDNA) شماره ۵–۱ نمونه‌های آنوفل فلوویاتیلیس و شماره ۶ کنترل منفی، M مارکر bp ۱۰۰ (شرکت سیناژن، ایران)



تصویر شماره ۲– طول باند 376bp در جمعیت‌های مختلف آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان چابهار حاصل از PCR بخش D3 ژن rDNA (D3 28S-rDNA) نمونه‌های آنوفل فلوویاتیلیس به شماره ۴–۱ و شماره ۵ کنترل منفی، M مارکر bp ۱۰۰ (شرکت سیناژن، ایران)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱- مشخصات توالی‌های حاصل از این مطالعه و سایر مطالعات دیگر که با شماره‌های دسترسی (Accession Numbers) برای بخش ITS2 و بخش D3 که در بانک جهانی ژن GeoBank به ثبت رسیده‌اند.

Taxon / Haplotype	Locus	Accession no.	Country	Reference
An. Fluviatilis Y	ITS2	AF167299	India	Mononmani et al. 2001
	ITS2	AF509342	Iran	Naddaf et al. 2003
	ITS2	AV172564	Iran	Djadid et al. unpublished
An. Fluviatilis T1	ITS2	DQ23849	India	Chen et al. 2006
An. Fluviatilis T2	ITS2	AF440788	Iran	Djadid et al. unpublished
	ITS2	DQ238491	Iran	Chen et al. 2006
An. Fluviatilis U	ITS2	DQ238492	India	Chen et al. 2006
An. Fluviatilis V	ITS2	AF333384	Iran	Djadid et al. unpublished
An. Fluviatilis X	ITS2	AF167298	India	Manonmani et al. 2001
An. Fluviatilis U	ITS2	GQ926569-89	Iran	This Study
An. Fluviatilis T	ITS2	GQ926590-91	Iran	This Study
An. Minimus A	ITS2	DQ238494	China	Chen et al. 2006
An. Flavirotris	ITS2	AB088384	Indonesia	Sawabe et a. unpublished
An. Fluviatilis	D3	EU334359-64	Iran	Naddaf et al. unpublished
An. Fluviatilis T	D3	AF437881	India	Singh et al. 2004
An. Fluviatilis T	D3	GQ888649, GQ888662	Iran	This Study
An. Fluviatilis U	D3	GQ888644-48 GQ888650-61 GQ888663-66	Iran	This Study
An. Fluviatilis T	D3	AJ512734	India	Chen et al. 2006
An. Fluviatilis S	D3	AF437880	India	Singh et al. 2004
An. Fluviatilis U	D3	AJ512735	India	Chen et al. 2006
An. Fluviatilis U	D3	AF437882	India	Singh et al. 2004
An. Flavirostris	D3	AJ512723	Indonesia	Chen et al. 2006

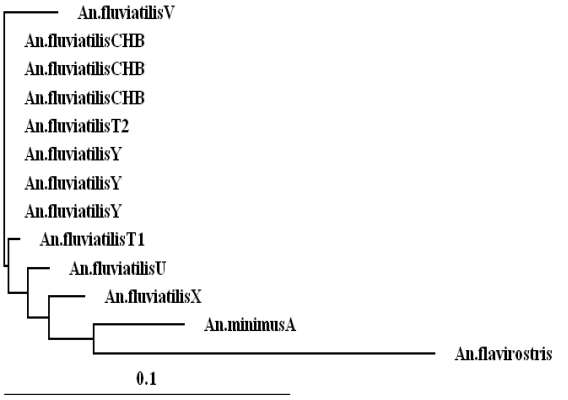
جهت آشکار نمودن اختلافات ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان چابهار، تعیین گونه‌های کمپلکس و نیز بررسی فیلوژنی در نمونه‌های مورد مطالعه، مجموعاً تعداد ۲۳ نمونه PCR از بخش ITS2 و ۲۳ نمونه PCR از بخش D3 گونه مورد نظر از منطقه تحت مطالعه تعیین توالی شدند. جهت مقایسه این توالی‌ها با سایر توالی‌های دیگر از نرم افزار Clustal X کمک گرفته شد. توالی‌های حاصل از این مطالعه با شماره‌های دسترسی (Accession Numbers) GQ926569-89 و GQ926590-91 برای بخش ITS2 و GQ888649, GQ888662، GQ888644-48، GQ888650-61 و GQ888663-66 برای بخش D3 در بانک جهانی ژن GenBank به ثبت رسیدند (جدول شماره۱). نتیجه مقایسه توالی‌های D3 و ITS2 توالی‌های بدست آمده این تحقیق با

www.SID.ir

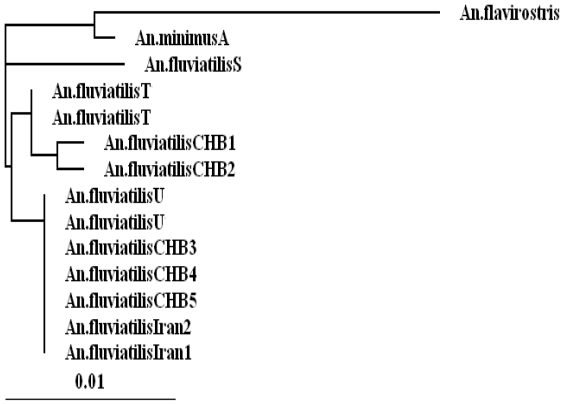
Archive of SID

سایر توالی‌های موجود در GenBank با استفاده از برنامه Blast نشان داد که نمونه‌های این پژوهش در بخش ITS2 متعلق به گونه T از کمپلکس فلوویاتیلیس می‌باشند. همچنین مقایسه دیگر توالی‌های بدست آمده با سایر توالی‌های موجود در GenBank نشان داد که همه نمونه‌های بخش D3 مشابه همدیگر نبوده و متعلق به دو گونه T و U از کمپلکس فلوویاتیلیس می‌باشند. این بررسی‌ها مشخص کرد که همه نمونه‌ها در بخش ITS2 صددرصد مشابه گونه T کمپلکس و در بخش D3، ۹۹-۱۰۰٪ مشابه گونه T و U کمپلکس فلوویاتیلیس می‌باشند.

در بررسی‌های فیلوژنی از توالی‌های گونه‌های An.minimus که نزدیک‌ترین گونه به آنوفل فلوویاتیلیس می‌باشد و نیز گونه An.flavirostris به عنوان نمونه‌های خارج از گروه فلوویاتیلیس (Outgroup) استفاده شد. این نتیجه‌گیری در بررسی‌های فیلوژنی هم مشاهده شد و نمونه‌های بخش ITS2 این مطالعه در درختهای فیلوژنی کنار An. fluviatilis T کشور هندوستان و ایران قرار گرفته و همگی یک شاخه اصلی را در درخت تشکیل دادند. ولی نمونه‌های بخش D3 در دو شاخه قرار می‌گیرند که این دو شاخه نمایانگر دو گونه An. fluviatilis T و An. fluviatilis U می‌باشند (تصویر ۳ و ٤).



تصویر شماره ۳- درخت فیلوژنی (کلادوگرام) جمعیتهای مختلف آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان چابهار حاصل از آنالیز ۳۷۴*bp* از بخش *ITS2* ژن *rDNA* نمونه‌های آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان چابهار با *An.fluviatilis CHB* در این درخت نشان داده شده است. توالی موجود یا سایر توالیهای گونه‌های کمپلکس آنوفل فلوویاتیلیس (گونه با هاپلوتایپ *V,T1,T2,Y,U,X*) و نیز *An.minimus A* و *An.flaviarostris* بعنوان گونه‌های خارج از گروه فلوویاتیلیس *(outgroups)* که از بانک جهانی ژن استخراج شده‌اند، مورد مقایسه قرار گرفته است. خط مقیاس در زیر درخت فیلوژنی اختلاف ژنتیکی بین نمونه‌ها را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۴- فیلوژنی جمعیتهای مختلف آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان چابهار حاصل از آنالیز 327 bp از بخش D3 ناحیه 28S ژن rDNA نمونه های آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان چابهار با *An.fluviatilis*CHB1-5 مشخص شده اند. توالی نمونه های چابهار با توالی بقیه نمونه های کمپلکس آنوفل فلوویاتیلیس (U,S,T)، نمونه ایرانی موجود در بانک جهانی ژن و نیز گونه های *An.minimus* A و *An.flavirostris* از بانک جهانی ژن مورد مقایسه قرار گرفته اند. مقیاس فاصله ژنتیکی بین نمونه ها در زیر درخت نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری:

طی تحقیقاتی که در سایر کشورهای مالاریاخیز دنیا صورت گرفته، مشخص شد که آنوفل فلوویاتیلیس کمپلکس، دارای ۳ گونه تأیید شده (S,T,U) و ۷ هاپلوتایپ یا ژنوتایپ به نام‌های S, U, T1, T2, Y, X و V می‌باشد که در انتقال بیماری با هم کاملاً متفاوت می‌باشند. همین بررسی‌ها نیز مشخص کرد که گونه T کمپلکس فلوویاتیلیس دارای سه هاپلوتایپ T1، T2 و Y می‌باشد. برای شناسایی گونه‌ها و پیدا نمودن اختلافات ژنتیکی احتمالی میان جمعیت‌های مختلف آنوفل فلوویاتیلیس، تمامی محصولات PCR گونه‌های صید شده از منطقه تحت مطالعه مورد سکونسینگ قرار گرفتند. آنالیز سکونس ITS2 همه نمونه‌های مطالعه شده نشان داد که طول محصول PCR آنها 514 bp می‌باشد که مشابه طول محصول PCR آنوفل فلوویاتیلیس کشور هند می‌باشند (۲۰). نتایج سکونس این مطالعه در مقایسه با سایر سکونسهای آنوفل فلوویاتیلیس موجود در بانک جهانی ژن نشان داد که هاپلوتیپ T2

www.SID.ir

Archive of SID

و Y از گونه T آنوفل فلوویاتیلیس در منطقه مورد مطالعه وجود دارد. رسم درخت شجره شناسی نیز نشان می‌دهد که جمعیتهای آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان چابهار مشابه هاپلوتیپهای T2 و Yدر یک شاخه اصلی Branch قرار می‌گیرند که همگی متعلق به گونه T می‌باشند. با آنالیز سکونس بخش D3 و مقایسه با سایر توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن مشخص شد که نمونه‌های شهرستان چابهار مشابه دو گونه T و U آنوفل فلوویاتیلیس کمپلکس می‌باشند. از ۲۳ نمونه‌ای که تعیین توالی شدند، ۲ نمونه گونه T توالی مشابه با هاپلوتیپهای T1و T2 داشته و توالی ۲۱ نمونه دیگر مشابه گونه U می‌باشد. نتایج آنالیز فیلوژنی ناحیه D3 مشخص می‌کند که نمونه‌های مورد مطالعه در دو شاخه قرار می‌گیرند که متعلق به دو گونه T و U آنوفل فلوویاتیلیس کمپلکس می‌باشند. نتایج آنالیز نشان می‌دهد که گونه U از لحاظ پراکندگی در شهرستان چابهار شیوع بیشتری نسبت به گونه T دارند. با توجه به اینکه طی بررسی‌های قبلی گونه T و هاپلوتیپ V از ایران گزارش شده بودند این تحقیق اولین گزارش از وجود گونه U را در ایران نشان می‌دهد (۳).

جمعیت‌های آنوفل فلوویاتیلیس T در هند تمایل زیادی به خونخواری از حیوانات دارند و ناقل ضعیفی برای بیماری مالاریا محسوب می‌شوند (۲۲). در حالی که در ایران این گونه نقش مهمی در انتقال مالاریای پایدار بر عهده دارد (۲). تفاوت در تمایل به خونخواری از انسان و یا حیوان نقش مهمی در ظرفیت انتقال (Vectorial capacity) بیماری توسط گونه‌های مختلف آنوفل دارد. این واقعیت بر خلاف وضعیت این آنوفل در کشور هند می‌باشد. این اختلاف در نقش یک گونه در دو منطقه متفاوت شاید بیشتر مربوط به اختلافات اکولوژیک در دو منطقه ایران و هند بویژه در دسترس بودن یا نبودن میزبان و حیوانات مناسب برای آنوفل باشد. مشابه این وضعیت در مورد نقش فرمهای بیولوژیک آنوفل استفنسی ایران و هند و پاکستان نیز قبلاً مشاهده شده است (۲۳،۲٤). برای مثال فرم Mysorensis آنوفل استفنسی یک ناقل ضعیف مالاریا در هند محسوب می‌شود در حالی که همین فرم در ایران و پاکستان ناقل مهم مالاریا به حساب می‌آید (۲۳،۲٤).

بر اساس این مطالعات مشخص شد که تعمیم نتایج دیگران برای سایر مناطق بایستی با احتیاط لازم صورت گیرد. با توجه به خصوصیات اکولوژیک در هر منطقه، بایستی مطالعات مستقل جهت تعیین نقش هر گونه آنوفل در انتقال مالاریا صورت گیرد. دلایل فراوانی برای بررسی‌های مولکولی و از جمله مطالعه ژنتیک ناقلین وجود دارد که می‌توان از ارتقاء شناخت اپیدمیولوژی بیماریها و بکارگیری روشهای جدید مولکولی کنترل و بالاخره حل معمای تفاوت موجود در ظرفیت ناقل‌ها و واکنش آنها به سموم مختلف کنترل نام برد (۲۷-۲۵). از طرف دیگر بکارگیری روشهای مولکولی در مطالعه ناقلین می‌تواند اطلاعات بهتری از مکانیسم‌های تکاملی گونه‌ها که منجر به ایجاد گونه‌های جدید می‌شوند، ارائه دهد. نتایج چنین پژوهشی درباره این گونه و سایر گونه‌های دیگر ناقل بیماری مالاریا می‌تواند در تصمیم‌گیری و برنامه‌ریزیهای کنترل مالاریا تأثیر مستقیم و بسیار زیاد داشته باشد.

سپاسگزاری:

نویسندگان مقاله از کلیه پرسنل معاونت بهداشتی استان سیستان و بلوچستان و مرکز بهداشت شهرستان چابهار بخصوص آقای عبدالغفار حسن زهی به خاطر همکاری در جمع‌آوری نمونه‌های این طرح صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند. این تحقیق با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

References

منابع

1. James SP. Malaria in India. Science of Medicine, Sanitary Department of India. 1902;2:1–106.
2. Eshghi N, Motabar M, Javadian E ,Manoutcheri AV. Biological features of Anopheles fluviatilis and its role in the transmission of malaria in Iran. *Trop Geogr Med*. 1976;28:41-44.
3. Naddaf Dezfouli SR, Oshaghi MA, Vatandoost H, Javadian E, Telmadarei Z, Assmar M. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and ITS2 PCR assays for differentiation of populations and putative sibling species of Anopheles fluviatilis (Diptera: Culicidae) in Iran. *Iranian J Publ Health*. 2002;31:133–137.
4. Nanda N, Joshi H, Subbarao SK, Yadav RS, Shukla RP, Dua VK, et al. Anopheles fluviatilis complex host feeding patterns of species S, T, and U. *J Am Mosq Cont Assoc*. 1996;12:147–149.
5. Chen B, Butlin RK, Pedro PM, Wang ZX, Harbach RE. Molecular variation Systemmatics and distribution of the Anopheles fluviatilis complex in southern Asia. *Med Vet Entomol*. 2006;20:33-43.
6. Rao RT. The Anophelines of India. Malaria Research Centre, Indian Council of Medical Research. New Delhi: 1984.
7. Subbaroa SK, Nanda N, Vasantha K, Dua VK, Malhorta MS, Yadav RS, et al. Cytogenic evidence for three sibling species in Anopheles fluviatilis (Diptera:Culicidae). *Ann Entomol Soc Am*. 1994;87:116-121.
8. Manonmani A, Townson H, Adeniran T, Jambulingam P, Sahu S, Vijayakumar T. rDNA-ITS2 polymerase Chain reaction assay for the sibling species of Anopheles fluviatilis. *Acta Trop*. 2001;78:3-9.
9. Manonmani A, Nanda N, Jambulingam P, Sahu S, Vijayakumar T, Ramyavani J. Comparison of polymerase chain reaction assay and cytotaxonomy for identification of sibling species of Anopheles fluviatilis (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res*. 2003;93:169-171.
10. Singh OP, Chandra D, Nanda N, Sharma SK, Htun PT, Adak T, et al. On the conspecificity of the Anopheles fluviatilis species S with Anopheles minimus species C. *J Biosci*. 2006;31:671-677.
11. Garros C, Harbach RE, Manguin S. Morphological assessment and molecular phylogenetics of the Funestus and Minimus Groups of Anopheles (Cellia). *J Med Entomol*. 2005;42:522–536.
12. Singh OP, Chandra D, Nanda N, Raghavendra K, Junil S, Sharma SK, et al. Differentiation of members of the Anopheles fluviatilis species complex by an allele-specific polymerase chain reaction based on 28S ribosomal DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70:27–32.
13. Nanda N, Yadav RS, Subbarao SK, Joshi H, Sharma VP. Studies on Anopheles fluviatilis and Anopheles culicifacies sibling species in relation to malaria in forested hilly and deforested riverine ecosystems in northern Orissa, India. *J Am Mosq Cont Ass*. 2000;16:199–205.
14. Sharma VP. Fighting malaria in India. *Current Science*. 1998;75:1127–1140.
15. Shahgudian ER. A key to the Anophelines of Iran. *Acta Med Iran*. 1960;3:38-48.
16. Ballinger-Crabtree ME, Black WC 4Th, Miller BR. Use of genetic polymorphisms detected by the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of Aedes aegypti subspecies and populations. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;47:893-901.
17. Litvaitis MK, Nunn G, Thomas WK, Kocher TD. A molecular approach for the identification of meiofaunal turbellarians (Piatyhelminthes, Turbellaria). *Marine Biol*. 1994;120:437-442.
18. Beebe NW, Saul A. Discrimination of all members of the Anopheles punctulatus complex by polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53:478-481.
19. Chen B, Harbach RE, Butlin RK. Molecular and morphological studies on the Anopheles minimus group of mosquitoes in southern China: taxonomic review, distribution and malaria vector status. *Med Vet Entomol*. 2002;16:253–265.

www.SID.ir

Archive of SID

20. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeunmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface. Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:4876-4882.

21. Subbarao SK. Anopheles Species Complex in South East Asian Region. New Delhi: Searo Technical Press; 1998.

22. Vatandoost H, Oshaghi MA, Abaie MR, Shahi M, Yaaghoobi F, Baghaii M, et al. Bionomics of Anopheles stephensi Liston in the malarious area of Hormozgan province, southern Iran. *Acta Trop*. 2006;97:196-203.

23. Oshaghi MA, Yaaghoobi F, Vatandoost H, Abaei MR, Akbarzadeh K. Anopheles stephensi biological forms; geographical distribution and malaria transmission in malarious regions of Iran. *Journal of Biological Sciences*. 2006;9:294–298.

24. Alano P. Molecular approaches to monitor parasite genetic complexity in the transmission of Plasmodium falciparum malaria. *Parassitologia*. 2005;47:199-203.

25. Greenwood B. The molecular epidemiology of malaria. *Trop Med Int Health*. 2002;7:1012-1021.

26. Norris DE. Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. *Int J Parasitol*. 2002;32:1607-1615.

27. Collins FH, Kamau L, Ranson HA, Vulule JM. Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bull World Health Organ*. 2000;78:1412-1423.

www.SID.ir

Archive of SID

Molecular identification of the Anopheles Fluviatilis complex in Sistan Va Baluchestan province

A. Mehravaran, MSc [1] M.A. Oshaghi, PhD [2] A. Ebrahimzadeh, PhD [3] M.I. Qureshi, BSc [4] A. Hasan Zehi, BSc [1]
Master of Medical Entomology & Vector , Control Research Center for Infections Disease & Tropical Medicine [1] , Associate Professor Department of Parasitology [3] , BSc Department of Microbiology [4] , Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran. Associate Professor Department of Medical Entomology & Vector Control [2] , Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

(Received 24 May, 2010 Accepted 28 Dec, 2010)

ABSTRACT

Introduction: Malaria is one of the most important health problems in developing countries. Malaria is endemic in southeast of Iran including Chabahar Township. One of the malaria vectors in Iran is Anopheles Fluviatilis James as other part of world, which is a complex of at least three cryptic species provisionally, designated as species S, T, and U. These species are morphologically indistinguishable, but can be identified by examination of species-specific fixed inversions in the polytene chromosomes. The aim of this study was to identify species composition of An. Fluviatilis complex using sequence analysis of D3 and ITS2 loci.

Methods: Specimens were captured using the methods of total catch, pit shelter, and human/animal night bite. The extraction of DNA was done. We then analyzed the sequence variation of the two loci of 28S D3- and ITS2-rDNA. Identification by phylogenetic trees and comparison of sequences with entries available in Gene Bank were carried out.

Results: We determined, in this study, both ITS2 and D3 loci and produced 514 bp and 376 bp bands. Sequence analysis of ITS2 region revealed that the specimens of Chabahar district were match to the Y and T2 haplotypes of the complex, both identical with An. Fluviatilis T. Furthermore, D3 sequencing determined that U species is also present in Chabahar district.

Conclusion: The present study revealed the presence of An. Fluviatilis U which is a new species in Iran. So precaution needs to be taken before generalization of results of an area to other areas. The results could help malaria vector control program.

Correspondence:
M.A. Oshaghi, PhD.
Department of Entomology & Vector Control, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences.
Tehran, Iran
Tel:+98 21 88954781
Email:
moshaghi@sina.tuns.ac.ir

Key words: Malaria – Polymerase Chain Reaction (PCR) – Iran

www.SID.ir