تعیین گونه‌های آنوفل فلوویاتیلیس کمپلکس به روش فیلوژنی و PCR-sequencing

احمد مهرآوران،[1] حسن وطن‌دوست،[2] محمدرضا عبائی،[3] عزت‌الدین جوادیان[2]
حمیده عدالت،[4] عبدالله گروهی،[5] فاطمه محترمی،[3] محمدعلی عشاقی[6]

۱. کارشناس ارشد حشره‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان
۲. استاد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، دانشکده بهداشت
۳. مربی حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، دانشکده بهداشت
۴. استادیار حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، دانشکده بهداشت
۵. کارشناس ارشد حشره‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان، مرکز بهداشت جیرفت
۶. دانشیار حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، دانشکده بهداشت

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۱/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۳/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: مالاریا در جنوب شرقی کشور از جمله شهرستان جیرفت به‌صورت اندمیک وجود دارد و در صورت مناسب شدن شرایط اپیدمیولوژیک می‌تواند بهداشت مردم منطقه را تهدید نماید. آنوفل فلوویاتیلیس یک گونه کمپلکس و یکی از مهمترین ناقلین مالاریا در ایران می‌باشد. این کمپلکس دارای سه گونه S ,T ,U و ۷ ژنوتایپ S، U، T1، T2، Y، X و V می‌باشد که در بیولوژی، اکولوژی و قدرت انتقال بیماری با هم کاملا متفاوت می‌باشند. بنابراین برنامه‌ریزی کنترل ناقلین بر اساس نوع گونه می‌تواند متفاوت باشد. هدف این مطالعه تعیین گونه‌های فلوویاتیلیس کمپلکس در منطقه مالاریاخیز جیرفت به کمک آنالیز توالی بخش‌های D_3 و ITS_2 ژن rDNA می‌باشد.

مواد و روش کار: نمونه‌های فلوویاتیلیس با استفاده از روش‌های صید کلی، شلتر پیت و گزش شبانه انسانی و حیوانی صید شدند. آزمایشات PCR دو بخش D_3 و ITS_2 روی DNA نمونه‌ها انجام شد و سپس محصولات PCR تعیین توالی شدند. توالی‌های به‌دست آمده به کمک مقایسه با نمونه‌های موجود در بانک جهانی ژن و درخت‌های فیلوژنی در سطح گونه و ژنوتایپ مورد شناسایی قرار گرفتند.

یافته‌ها: لوکوس‌های D_3 به طول ۳۷۶bp و ITS_2 به طول ۵۱۴bp به کمک PCR تکثیر شدند و توالی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بررسی‌ها نشان داد که نمونه‌های فلوویاتیلیس شهرستان جیرفت مشابه ژنوتایپ‌های T_2 و Y گونه T کمپلکس آنوفلس فلوویاتیلیس می‌باشند.

نتیجه‌گیری: گونه T تنها گونه شناخته شده کمپلکس فلوویاتیلیس در جیرفت می‌باشد و بر اساس شواهد مطالعات قبلی می‌تواند ناقل مالاریا در منطقه باشد.[م ت ع پ ز ، ۱۳(۱): ۹-٤]

کلیدواژه‌ها: مالاریا، آنوفل فلوویاتیلیس، PCR، شناسایی گونه، rDNA

مقدمه

اکثر گونه‌های ناقل مالاریا جزء گونه‌های کمپلکس هستند. این گونه‌ها از نظر مورفولوژی کاملا مشابه بوده ولی از نظر اکولوژی، بیولوژی، تمایل به خون‌خواری از انسان (آنتروپوفیلی) و مقاومت به حشره‌کش‌ها با هم متفاوت هستند. این تفاوت‌ها در پتانسیل انتقال بیماری توسط گونه‌های مختلف یک کمپلکس تاثیر می‌گذارد و در این حالت بعضی از گونه‌ها ناقل و بعضی دیگر غیرناقل می‌باشند. لذا شناخت صحیح گونه‌های ناقل و غیرناقل در برنامه‌های کنترل ناقلین و بیماری در هر منطقه بسیار اهمیت دارد.

آنوفل فلوویاتیلیس *Anopheles fluviatilis* به‌عنوان یک ناقل مالاریا در ایران شناخته شده است و نقش مهمی در انتقال بیماری مالاریا در برخی مناطق اندمیک دارد.[1,2] مطالعه این گونه در کشور نشان می‌دهد که شاخص خون‌خواری ازانسان از ۳/۴ تا ۲۸/۶ درصد، میزان اسپوروزئیت از صفر تا ۱۱درصد و مکان‌های استراحت از اماکن داخلی (اندوفیل) تا خارجی (اگزوفیل) متفاوت بوده است.[1] این تفاوت‌ها در مطالعات انجام شده بر روی این آنوفل در سایر کشورها نیز گزارش شده است.[3-7] مطالعات کروموزوم‌های پلی‌تن این گونه در هند نشان داد که سه گونه به نام‌های S ,T U, وجود دارد.[8] در سال ۲۰۰۱ از یکی از ایالت‌های شرق هند با مطالعات ملکولی بخش Internal Transcribed Spacer II (ITS_2) ژن 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.[9] تحقیقات هم زمان ملکولی و کروموزومی بعدی نشان داد که ۹۴درصد ژنوتایپ‌های X همان گونه S و ۹۰ درصد ژنوتایپ‌های Y همان گونه T بودند.[10] در ایران با مطالعه‌ای که بر روی خصوصیات ملکولی جمعیت‌هایی از این گونه در کشور صورت گرفت مشخص شد که تمامی نمونه‌ها ۱۰۰ درصد مشابه گونه T (گونه Y) هند هستند.[2,11] اخیرا جهت تفکیک گونه‌های S، T و U از آزمایش PCR بخش سوم (D_3) ژن rDNA نیز کمک گرفته شده است.[12-14] مطالعه Chen وهمکارانش که در بخش ITS_2 روی پشه‌های آنوفل کشورهای چین، تایلند، ویتنام، هند، نپال، پاکستان و ایران صورت گرفت، نشان داد که بخش ITS_2 دارای شش هاپلوتیپ می‌باشد که سه هاپلوتیپ T_1، T_2، Y مربوط به آنوفل فلوویاتیلیس T و سه هاپلوتیپ دیگر شامل X، V و U می‌باشند.[6] آنوفل فلوویاتیلیس S عمدتا گونه‌ای انسان دوست و ناقل اصلی مالاریا در نواحی تپه‌ای و کوهپایه‌ای هند می‌باشد[3,5,15,16] گونه‌های T و U اغلب حیوان دوست، غیرناقل وبا قدرت انتقال ضعیف[5] ناقل

۴ آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت،گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین email: moshaghi@sina.tums.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

اصلی بیماری مالاریا در ایران، پاکستان، و نپال می‌باشد.[۱۰،۲،۱۱] با توجه به این که شهرستان جیرفت از کانون‌های بیماری مالاریا می‌باشد و گونه آنوفل فلوویاتیلیس یکی از آنوفل‌های مهم منطقه محسوب می‌شود لذا تشخیص گونه‌های این کمپلکس و تفکیک آن‌ها از هم‌دیگر می‌تواند در برنامه‌ریزی کنترل ناقلین مالاریا و هدفمند کردن و افزایش کارآیی مبارزه کمک شایانی نماید. هدف این مطالعه تشخیص گونه‌های کمپلکس فلوویاتیلیس منطقه جیرفت به کمک روش نوین ملکولی PCR از طریق بررسی ساختار دو ژن ITS_2 و D_3 می‌باشد.

روش‌کار

این مطالعه توصیفی در شهرستان جیرفت واقع در استان کرمان انجام گرفت. این شهرستان در فصل انتقال بیماری مالاریا دارای آب و هوای گرم است. منطقه مورد مطالعه از لحاظ توپوگرافی دارای دو بخش کوهستانی و دشت می‌باشد. در این مطالعه برای جمع‌آوری نمونه‌ها از روش استانداردی که توسط سازمان بهداشت جهانی ارائه شده است استفاده گردید.[۱۷،۱۸] بدین منظور روستاهای دریاچه و دوبنه از ناحیه کوهستانی در شمال شهرستان جیرفت و روستای سفیدباز از منطقه دشت در جنوب شهرستان جیرفت انتخاب شدند و با روش استاندارد به مدت نه ماه (از فروردین تا آذرماه سال ۱۳۸۵که معادل فصل فعالیت پشه‌ها در منطقه است) هرماه دو بار نمونه‌برداری انجام شد. بالغین به روش‌های صید کلی، گزش شبانه انسانی و حیوانی و شلترپیت صید شدند (جدول ۱). نمونه‌ها پس از صید با استفاده از کلید تشخیص شاهگودیان[۱۹] شناسایی و جهت آزمایشات ملکولی در دمای $-۲۰^{o}C$ نگهداری شدند.

جدول ۱: جزئیات نمونه‌های آنوفل فلوویاتیلیس منطقه جیرفت که توالی بخش‌های ITS_2 و D_3 آن‌ها تعیین شده است.

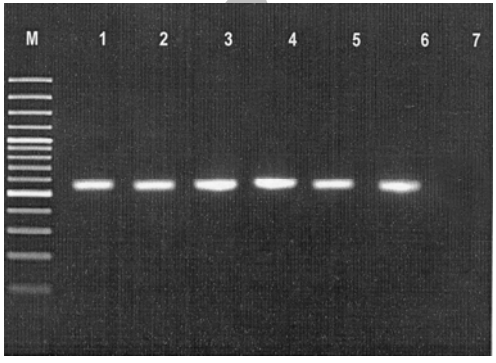
تعداد توالی بخش		روش صید	محل صید	جغرافیا	روستا
D_3	ITS_2				
۳	۳	اسپیراتور	از روی حیوان یا انسان	دشت	دریاچه
۱	۱	اسپیراتور	حفر گودال	دشت	دریاچه
۱	۱	اسپری حشره‌کش Pyrethrum	داخل اماکن مسکونی	دشت	دریاچه
۱	۱	اسپیراتور	حفر گودال	تپه ماهوری	دریاچه
۱	۱	اسپیراتور	از روی حیوان یا انسان	کوهستانی	سفیدباز
۱	۱	اسپری حشره‌کش Pyrethrum	داخل اماکن مسکونی	کوهستانی	سفیدباز

جهت استخراج DNA نمونه‌ها از روش فنل-کلروفرم استفاده شد.[۲۰،۲۱] سپس به کمک واکنش‌های زنجیره‌ای PCR از DNA تهیه شده جهت تکثیر بخش D_3 (قسمتی از ناحیه 28S ژن rDNA) و نیز بخش ITS_2 استفاده شد. محصولات PCR تعدادی از نمونه‌ها جهت تعیین توالی دو بخش D_3 و ITS_2 با استفاده از پرایمرهای Litvaitis و Beebe تعیین توالی شدند.[۲۲،۲۳] محصول PCR تکثیر شده D_3، کل ناحیه D_3، ناحیه بین D_2 و D_3 و نیز ناحیه بین D_3 و D_4 را در بر می‌گیرد.[۶] برای آزمایشات PCR از دستورالعمل Chen و همکاران استفاده گردید.[۲۳] محصولات PCR در ژل ۱/۲ درصد برای ITS_2 و ۱/۵ درصد برای D_3 الکتروفورز شدند و به کمک اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی، با نور ماورای بنفش مشاهده و با دستگاه تصویربرداری Gel documentary از محصولات تصویربرداری شد.

از هر نمونه DNA، مقدار ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر محصول PCR جهت تعیین توالی تهیه شد (جدول ۱) و جهت تعیین توالی به شرکت Seqlab کشور آلمان فرستاده شدند. جهت تعیین درستی توالی‌ها، تشخیص گونه‌ها و روابط فیلوژنی نمونه‌های مورد مطالعه و نمونه‌های موجود در بانک جهانی ژن، توالی‌های به دست آمده به کمک نرم افزار Online Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) موجود در Pubmed آزمایش و با سایر توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن مقایسه شدند. هم چنین توالی‌های D_3 و ITS_2 به‌کمک نرم افزار Clustal X Online [۲۴] هم‌تراز (Alignment) و سپس با یکدیگر مقایسه شدند. توالی‌های حاصل از این مطالعه با شماره‌های دسترسی GQ857439-46 برای بخش ITS_2 و GQ864403-10 برای بخش D_3 در بانک جهانی ژن ثبت شدند. درخت‌های فیلوژنی به روش Maximum parsimony تهیه و به کمک نرم‌افزار TREEVIEW رسم شدند.

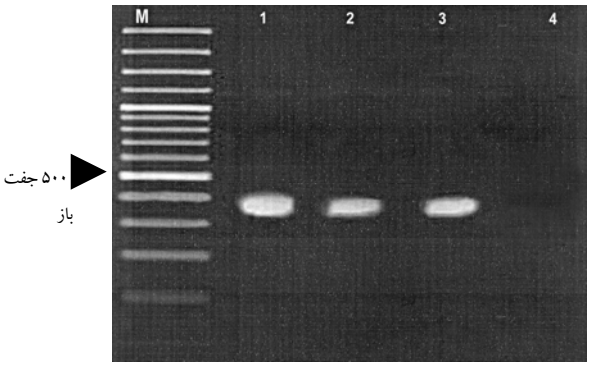
یافته‌ها

در این مطالعه تعداد ۹۰۴ پشه آنوفل صید شد. البته به خاطر گرمای شدید و نیز خشک‌سالی چند سال اخیر به طور کلی فراوانی آنوفل‌های منطقه در زمان مطالعه پایین بود. نتایج مطالعات مرفولوژیک نمونه‌ها نشان داد که گونه‌های An.stephensi، An.culicifacies، An.dthali، An.sergenti، An.turkhodi، An.superpictus، An.fluviatilis، An.pulcherrimu در شهرستان جیرفت در مناطق مورد مطالعه وجود دارد. از ده نمونه آنوفل فلوویاتیلیس به‌عنوان نماینده جمعیت آنوفل فلوویاتیلیس منطقه با روش فنل-کلروفرم DNA استخراج شد و در واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش‌های PCR برای دو بخش D_3 و ITS_2 با موفقیت انجام گرفت و محصولاتی به طول bp ۵۱۴ برای ITS_2 و به طول bp ۳۷۶ برای D_3 تولید شدند (تصاویر ۱ و ۲).



تصویر ۱: نتایج حاصل از PCR بخش ITS_2 ژن rDNA به طول bp ۵۱۴ در جمعیت‌های مختلف آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان جیرفت. شماره ۶-۱ نمونه‌های آنوفل فلوویاتیلیس و شماره ۷ کنترل منفی، M مولکولار مارکر bp ۱۰۰ (شرکت سیناژن، ایران).

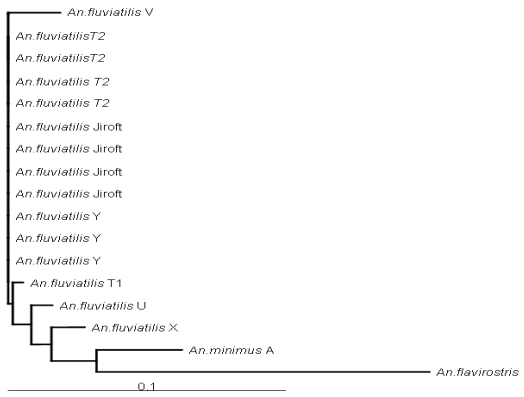
Archive of SID
www.SID.ir



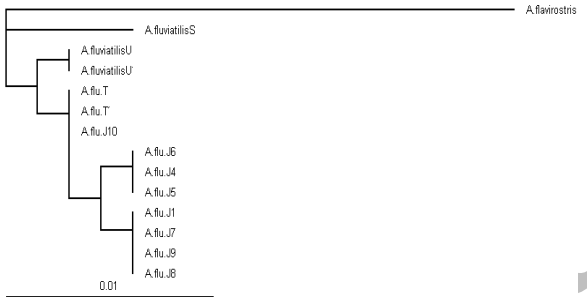
تصویر ۲: نتایج حاصل از PCR بخش D_3 ناحیه 28S ژن rDNA به طول bp ۳۷۶ در جمعیت‌های مختلف آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان جیرفت. شماره ۳-۱ نمونه‌های آنوفل فلوویاتیلیس و شماره ۴ کنترل منفی، M مولکولار مارکر bp ۱۰۰ (شرکت سیناژن، ایران).

باند تولید شده بخش ITS_2 شامل bp ۱۱۲ از ژن S ۵/۸، pb ۳۷۴ تمام بخش ITS_2 و bp ۲۸ از ژن S ۲۸ واحدهای rDNA می‌باشد. محصول PCR بخش D_3 معادل bp ۳۷۶ بود که شامل bp ۱۳ از ناحیه بین D_2 و D_3، تمام ناحیه D_3 به طول bp ۱۶۸ و حدود bp ۱۹۵ از ناحیه بین D_3 و D_4 ژن S ۲۸ واحدهای rDNA می‌باشد.

برای مقایسه جمعیت‌های مختلف آنوفلس فلوویاتیلیس شهرستان جیرفت، تعیین اعضای گونه کمپلکس، پیدا نمودن اختلافات ژنتیکی احتمالی میان آن‌ها و نیز بررسی فیلوژنی نمونه‌های مورد مطالعه در مجموع تعداد هشت نمونه PCR از بخش ITS_2 و هشت نمونه PCR از بخش D_3 گونه مورد نظر از مناطق تحت مطالعه تعیین توالی شدند (تصاویر ۳و۴). بخش ITS_2 تعیین توالی شده شامل bp ۱۱۲ از ناحیه ۵/۸S، تمام بخش ITS_2 به طول bp ۳۷۴ و bp ۲۸ از ناحیه ۲۸S می‌باشد. توالی‌های به‌دست آمده فاقد هرگونه بخش نامطمئن و غیرخوانا بودند و در مقایسه با یکدیگر هیچ‌گونه تفاوت و یا موتاسیونی در طول قطعه تعیین توالی شده وجود نداشت. در حدود bp ۳۳۷ از بخش D_3 نمونه‌های جیرفت نیز تعیین توالی شدند. برای مقایسه توالی‌ها با یکدیگر و نیز مقایسه با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن، طول توالی‌ها یکسان شدند و در مجموع bp ۳۲۷ از bp ۳۳۷ بخش مربوطه انتخاب و مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. این بخش با طول bp ۳۲۷ شامل bp ۱۳ از ناحیه بین D_2 و D_3، تمام بخش D_3 به طول bp ۱۶۸و bp ۱۴۶ از ناحیه بین D_3 و D_4 از ژن 28S rDNA می‌باشد. نتیجه مقایسه توالی‌های D_3 و ITS_2 به‌دست آمده از این مطالعه با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از برنامه Blast نشان داد که نمونه‌های این پژوهش با نمونه‌های آنوفل فلوویاتیلیس کشور هند کاملا مشابه است و صحت نمونه‌های مورد بررسی مشخص شد. مقایسه توالی‌های به دست آمده با یکدیگر نشان داد که همه نمونه‌ها چه در بخش ITS_2 و چه در بخش D_3 کاملا مشابه بوده و همه متعلق به یک گونه از کمپلکس فلوویاتیلیس می‌باشند (تصویر ۳).



تصویر ۳: درخت فیلوژنی (کلادوگرام) حاصل از آنالیز bp ۳۷۴ از بخش ITS_2 ژن rDNA. ۴ نمونه از آنوفل فلوویاتیلیس شهرستان جیرفت (An.fluviatilis Jiroft) در این درخت نشان داده شده است. توالی بقیه گونه‌های کمپلکس آنوفلس فلویاتیلیس (گونه یا هاپلوتایپ V, T1, T2, Y, U, X) و نیز An.minimus A و An.flavirostris به‌عنوان گونه‌های خارج از گروه فلوویاتیلیس (outgroups) از بانک جهانی ژن استخراج شده‌اند. خط مقیاس در زیر کلادوگرام فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها را نشان می‌دهد.



تصویر ۴: درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز bp ۳۲۷ از D_3 ناحیه 28S ژن rDNA. نمونه‌های آنوفلس فلوویاتیلیس شهرستان جیرفت (An.fluviatilis Jiroft) مشخص شده‌اند. توالی بقیه نمونه‌های کمپلکس فلویاتیلیس (U,S,T)، نمونه ایرانی موجود بانک جهانی ژن An.fluviatilis، و نیز گونه‌های An.minimus A و An.flavirostris از بانک جهانی ژن استخراج شده‌اند. مقیاس اختلاف ژنتیکی بین نمونه‌ها در زیر درخت نشان داده شده است.

این بررسی‌ها مشخص کرد که همه نمونه‌ها در بخش ITS_2 صددرصد مشابه هاپلوتیپ T_2 یا Y از گونه T کمپلکس و در بخش D_3 ۹۹ تا ۱۰۰ درصد مشابه گونه T کمپلکس فلوویاتیلیس می‌باشند. این نتیجه‌گیری در بررسی‌های فیلوژنی هم مشاهده شد و نمونه‌های این مطالعه در درخت‌های فیلوژنی کنار گونه An.fluviatilis T کشور هندوستان و ایران قرار گرفته و همه یک شاخه اصلی را در درخت تشکیل دادند (تصویر ۳). در بررسی‌های فیلوژنی از توالی‌های گونه‌های An.minimus که نزدیک‌ترین گونه به آنوفل فلوویاتیلیس می‌باشد و نیز گونه An.flavirostris به‌عنوان نمونه‌های خارج از گروه فلوویاتیلیس (Outgroup) استفاده شد. میزان بازهای گوانین و سیتوزین (G-C content) نوکلئوتیدهای قطعه ITS_2 برای هشت نمونه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف منطقه مورد مطالعه ۵۵ درصد بود.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

این مطالعه نشان داد که در شهرستان جیرفت از کمپلکس آنوفلس فلوویاتیلیس ژنوتایپ‌های T_2 و Y وجود دارند که هر دو نماینده گونه T کمپلکس می‌باشند. آنالیز توالی ITS_2 در همه نمونه‌های مطالعه شده نشان داد که طول محصول PCR آن‌ها bp ۵۱۴ می‌باشد که مشابه طول محصول PCR آنوفلس فلوویاتیلیس کشور هند می‌باشد.[۹-۱۱] میزان بازهای گوانین و سیتوزین (G-C content) نوکلئوتیدهای قطعه ITS_2 به‌دست آمده در این مطالعه با مطالعات قبلی در ایران و سایر مناطق دنیا مطابقت دارد.[۹-۱۲]

در بررسی‌های بخش ITS_2 گونه T کمپلکس فلوویاتیلیس سه هاپلوتایپ T_1 ، T_2 و Y گزارش شده است که نمونه‌های آنوفلس فلوویاتیلیس منطقه جیرفت مشابه هاپلوتیپ T_2 و Y بودند بنابراین می‌توان بیان کرد که گونه T آنوفلس فلوویاتیلیس کمپلکس در منطقه مورد مطالعه وجود دارد. این نتیجه‌گیری با آنالیز توالی بخش D_3 نیز تایید شد و در مقایسه با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن مشخص شد که نمونه‌های جیرفت مشابه گونه T آنوفل فلوویاتیلیس کمپلکس می‌باشند. علاوه بر این توالی‌های این مطالعه نشان دادند که بعضی از نمونه‌ها تنها در موقعیتی که دو گونه T و U را جدا وشناسایی می‌کند (نوکلئوتید G برای گونه T و نوکلئوتید A برای گونه U) نامشخص بودند و ممکن است در منطقه جیرفت گونه U نیز وجود داشته باشد که برای مشخص شدن این مطلب باید نمونه‌های بیشتری مورد مطالعه قرار گیرد. لازم به ذکر است که به طور کلی توالی‌های دو گونه T و U از کمپلکس آنوفل فلوویاتیلیس شباهت بسیار زیادی به هم دارند آن‌ها فقط در یک باز با هم تفاوت دارند. در این مطالعه به‌واسطه شرایط نامناسب محیطی به ویژه خشک‌سالی در زمان مطالعه، فراوانی آنوفل‌ها به شدت کاهش یافته بودند. هرچند بیش از ۹۰۰ نمونه آنوفل صید شد ولی ما نتوانستیم تعداد زیادی آنوفل فلوویاتیلیس صید کنیم. هر چند که در شرایط مناسب هم فراوانی این آنوفل نسبت به سایر آنوفل‌ها مانند آنوفل استفنسی و کولیسیفاسیس کمتر می‌باشد. با این‌حال توصیه می‌شود در شرایط مناسبتری این مطالعه تکرار شود تا ترکیب گونه‌های این کمپلکس در منطقه با اطمینان بالاتری مشخص شود. جمعیت‌های آنوفل فلوویاتیلیس T در هند تمایل زیادی به خون‌خواری از حیوانات دارند و ناقل ضعیفی برای بیماری مالاریا محسوب می‌شوند.[۲۵] در حالی‌که در ایران این گونه نقش مهمی در انتقال مالاریای پایدار بر عهده دارد.[۱] تفاوت در تمایل به خون‌خواری از انسان و یا حیوان نقش مهمی در ظرفیت انتقال (Vectorial capacity) بیماری توسط گونه‌های مختلف آنوفل دارد. در این مطالعه مشخص شد که تنها گونه T آنوفل فلوویاتیلیس در منطقه وجود دارد و مطالعات قبلی هم نشان داده است که این گونه در ایران در انتقال مالاریا نقش دارد. این واقعیت برخلاف 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 به ویژه در دسترس بودن یا نبودن میزبان و حیوانات مناسب برای آنوفل باشد. مشابه این وضعیت در مورد نقش فرم‌های بیولوژیک آنوفل استفنسی ایران، هند و پاکستان نیز قبلا مشاهده شده است. برای مثال فرم Mysorensis آنوفل استفنسی یک ناقل ضعیف مالاریا در هند محسوب می‌شود در حالی‌که همین فرم در ایران و پاکستان ناقل مهم مالاریا به حساب می‌آید.[۲۵،۲۶] براساس 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 آنوفل در انتقال مالاریا صورت گیرد.

بررسی‌های مولکولی در مطالعات اپیدمیولوژیک بسیار خوب، سریع و دقیق عمل می‌کنند و امروزه در سطح وسیعی از آن‌ها در زمینه‌های مختلف از جمله شناسایی انگل، ناقل، مقاومت ناقلین به حشره‌کش‌ها، تعیین نوع خون خورده شده و آلودگی ناقلین به انگل بیماری استفاده می‌شود.[۲۷-۳۲] این گونه مطالعات می‌تواند منجر به افزایش شناخت بهتر اپیدمیولوژی بیماری از جمله درک تفاوت‌های موجود در ظرفیت انتقال بیماری در ناقلین شود و در تصمیم‌گیری و برنامه ریزی‌های کنترل بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از سرکار خانم مشایخی و آقای آزادآور به خاطر همکاری در جمع‌آوری نمونه‌های این طرح سپاسگزاری می‌گردد. این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی تهران طی گرانت شماره ۸۶-۰۱-۲۷-۵۴۳۹ پشتیبانی مالی شده است.

References

1. Eshghi N, Motabar M, Javadian E, et al. Biological features of Anopheles fluviatilis and its role in the transmission of malaria in Iran. Trop Geogr Med 1976; 28(1): 41-44.
2. Naddaf SR, Oshaghi MA, Vatandoost H, et al. 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 Pub Health 2002; 31(3-4): 133-137.
3. Sahu SS, Gunasekaran K, Jambulingam P. Bionomics of Anopheles minimus and An. fluviatilis (Diptera: Culicidae) in east-central India, endemic for falciparum malaria: human landing rates, host feeding, and parity. J Med Entomol 2009; 46(5): 1045-51.
4. Sahu SS, Gunasekaran K, Jambulingam P, et al. Identification of Anopheles fauna in a hyperendemic falciparum area of Orissa State, India. Indian J Med Res 2008; 127(2): 178-82.
5. Nanda N, Joshi H, Subbarao SK, et al. Anopheles

Archive of SID
www.SID.ir

fluviatilis complex host feeding patterns of species S, T, and U. Am Mosq Control Assoc 1996; 12(1): 147-149.
6. Chen B, Butlin RK, Pedro PM, et al. Molecular variation Systemmatics and distribution of the Anopheles fluviatilis complex in southern Asia. Med Vet Entomol 2006; 20(1): 33-43.
7. Parida SK, Hazra RK, Marai N, et al. Host feeding patterns of malaria vectors of Orissa, India. J Am Mosq Control Assoc 2006; 22(4): 629-34.
8. Subbaroa SK, Nanda N, Vasantha K, et al. Cytogenic evidence for three sibling species in Anopheles fluviatilis (Diptera:Culicidae). Ann Entomol Soc Am 1994; 87(1): 116-121.
9. Manonmani A, Townson H, Adeniran T, et al. rDNA-ITS2 polymerase chain reaction assay for the sibling species of Anopheles fluviatilis. Acta Trop 2001; 78(1): 3-9.
10. Manonmani A, Nanda N, Jambulingam P, et al. Comparison of polymerase chain reaction assay and cytotaxonomy for identification of sibling species of Anopheles fluviatilis (Diptera: Culicidae). Bull Entomol Res 2003; 93(2): 169-171.
11. Naddaf Dezfouli SR, Oshaghi MA, Vatandoost H, et al. Molecular characterization of the Anopheles fluviatilis species complex in Iran. EMHJ 2003; 9(3): 257-265.
12. Singh OP, Chandra D, Nanda N. On the conspecificity of the Anopheles fluviatilis species S with Anopheles minimus species C. J Biosci 2006; 31(5): 671-677.
13. 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(4): 522-536.
14. Singh OP, Chandra D, Nanda N. 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(1): 27-32.
15. Nanda N, Yadav RS, Subbarao SK, et al. 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 Control Assoc 2000; 16(3): 199-205.
16. Sharma VP. Fighting malaria in India. Current Science 1998; 75: 1127-1140.
17. World Health Organization. Practical entomology in malaria eradication. Part I, 1963. Geneva.
18. World Health Organization. Manual of Practical Entomology in Malaria. Part II, 1975. Geneva.
19. Shahgudian ER. A key to the Anophelines of Iran. Acta Medica Iranica 1960; 3(3): 38-48.
20. Ballinger-Crabtree ME, Black IVWC, 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(6): 893-901.
21. Litvaitis MK, Nunn G, Thomas WK and Kocher TD. A molecular approach for the identification of meiofaunal turbellarians (Piatyhelminthes, Turbellaria). Marine Biol 1994; 120: 437-442.
22. 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(5): 478-481.
23. 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(3): 253-265.
24. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface. Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 1997; 25(24): 4876-4882.
25. Vatandoost H, Oshaghi MA, Abaie MR, et al. Bionomics of Anopheles stephensi Liston in the malarious area of Hormozgan province, southern Iran 2002. Acta Trop 2006; 97(2): 196-203.
26. Oshaghi MA, Yaaghoobi F, Vatandoost H, et al. Anopheles stephensi biological forms; geographical distribution and malaria transmission in malarious regions of Iran. Pakistan J Biol Sci 2006; 9(2): 294-298.
27. Alano P. Molecular approaches to monitor parasite genetic complexity in the transmission of Plasmodium falciparum malaria. Parassitologia 2005; 47(2): 199-203.
28. Mohanty A, Kar P, Mishra K, et al. Multiplex PCR assay for the detection of Anopheles fluviatilis species complex, human host preference, and Plasmodium falciparum sporozoite presence, using a unique mosquito processing method. Am J Trop Med Hyg 2007; 76(5): 837-43.
29. Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. Exp Parasitol 2006; 114(4): 259-64.
30. Greenwood B. The molecular epidemiology of malaria. Trop Med Int Health 2002; 7(12): 1012-21.
31. Norris DE. Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. Int J Parasitol 2002; 32(13): 1607-15.
32. Collins FH, Kamau L, Ranson HA, et al. Molecular entomology and prospects for malaria control. Bull World Health Organ 2000; 78(12): 1412.

Archive of SID

www.SID.ir

Species identification of the Anopheles fluviatilis complex using PCR-sequencing and phylogenetic analysis in Jiroft district, Kerman province

Ahmad Mehravaran[1], Hasan Vatandoost[2], Mohammad R. Abai[2], Ezatodin Javadian[2], Hamideh Edalat[2], Abdollah Grouhi[3], Fatemeh Mohtarami[2], Mohammad A. Oshaghi[2]

Received: 22/Mar/2010
Accepted: 14/Jun/2010

Background: Malaria is endemic in southeastern Iran including Jiroft district and in favorite epidemiological condition could threaten the people health. Anopheles fluviatilis complex is a malaria vector in Iran and consists of three species of S, T, and U and 7 genotypes of S, U, T_1, T_2, Y, X and V which are different in vectorial capacity. The aim of this study was to identify species composition of An.fluviatilis complex using D_3 and ITS_2 sequences in Jiroft district.

***Materials and Method*:** Mosquitoes of An. fluviatilis have been captured using total catch, pit shelter, and human/animal night baits. PCR amplification was done against the 28S D_3 and ITS_2-rDNA and the products were sequenced. The specimens were identified to species and genotype level using phylogenetic trees and comparison of sequences with entries available in GenBank.

Results: Both ITS_2 and D_3 loci were successfully amplified and produced 514 bp and 376 bp bands respectively. Sequence analysis of ITS_2 and D_3 regions revealed that the specimens of Jiroft district were matching to the Y and T_2 haplotypes of species T of the complex.

Conclusion: Anopheles fluviatilis T is the only species in the region and based on the previous studies can be incriminated as the main malaria vector in the region. [ZJRMS, 13(1): 4-9]

Keywords: Plasmodium infections, Anopheles fluviatilis, PCR, rDNA, vector

1. **MSc of Medical Entomology, Research Center for Infectious Diseases and Tropical Medicine, Zahedan University of Medical Sciences and Health Services, Zahedan, Iran.**
2. **Professor of Medical Entomology and Vector Control Group, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.**
3. **Instructor of Medical Entomology and Vector Control Group, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.**
4. **Assistant Professor of Medical Entomology and Vector Control Group, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.**
5. **MSc of Medical Entomology, Kerman University of Medical Sciences, Jiroft Health Center, Jiroft, Iran.**
6. **Associate Professor of Medical Entomology and Vector Control Group, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.**

Archive of SID

Please cite this article as: Mehravaran A, Vatandoost H, Abai MR, Javadian E, Edalat H, Grouhi A, Mohtarami F, Oshaghi MA. Species identification of the Anopheles fluviatilis complex using PCR-sequencing and phylogenetic analysis in Jiroft district, Kerman province. Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS) 2010; 13(1): 4-9.

www.SID.ir