

Review article

Morphological Characteristics and Molecular Markers in Identification of *Anopheles gambiae* Complex and *Anopheles stephensi* Members as Main Malaria Vectors in Africa and Asia

Zahra Asadi Saatlou^{1,2}Navid Dinparast Djadid³Saber Raeghi⁴Naseh Maleki-Ravasan³Saber Gholizadeh^{5,6*}

- 1- MSc Student in Medical Entomology and Vector Control, Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
- 2- MSc Student in Medical Entomology and Vector Control, Medical Entomology Department, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
- 3- Professor of Molecular Medical Entomology, Malaria and Vector Research Group, National Insectarium, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
- 4- Assistant Professor of Medical Parasitology, Department of Laboratory Sciences, Maragheh University of Medical Sciences, Maragheh, Iran
- 5- Associate Professor of Medical Entomology and Vector Control, Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
- 6- Associated Professor of Medical Entomology and Vector Control, Medical Entomology Department, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

***Corresponding author:** Saber Gholizadeh, Medical Entomology Department, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Email: sabergholizadeh@yahoo.com,
saber@umsu.ac.ir

Received: 26 June 2018

Accepted: 21 December 2018

ABSTRACT

Introduction and purpose: Human malaria is one of the widespread vector-borne diseases worldwide. Lots of efforts have been made to control and eliminate the vectors of the disease. *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* (*A. stephensi*) are the main vectors of malaria in Africa and Asia. The members of *Anopheles gambiae* complex contain the vector and non-vector species. *A. stephensi* has three biological forms with different vector capacities. The phenotypic and genotypic diversity has made it more difficult to identify vector populations and consequently the surveillance and control of malaria. The present study aimed to compare the morphological and molecular diagnostic characteristics of the two important malaria vectors in the two world continents.

Methods: After searching, studying, and organizing published papers related to the subject, *Anopheles gambiae* and *A. stephensi* species were compared based on the morphological and molecular characteristics. Different morphological keys for the two species, the specimens from the insectarium of Urmia University of Medical Sciences, as well as the present species of national insectarium in Pasteur Institute of Iran, were used for morphological comparison. In addition, all the present sequences of five molecular markers, including COI, COII, D3, ITS2, and OBP1, were extracted from GenBank and analyzed using bioinformatics software.

Results: Based on the obtained results of the present study, the number of ridges on *Anopheles gambiae* eggs was more than that on *A. stephensi* eggs. However, unlike *A. stephensi* in *Anopheles gambiae*, the number of ridges was not a diagnostic characteristic for the identification of *Anopheles gambiae* complex. There were four diagnostic characteristics in the larvae comparison of the two species and there were three different characteristics in adults. All the molecular markers were capable of separating the two species; however, ITS2 and D3, as well as COI, COII, and OBP1 markers were preferred for inter-species and intra-species comparisons, respectively.

Conclusion: The combination of traditional diagnostic and new molecular methods can be simultaneously used in inter-species separation. As a result, in order to eliminate malaria in Iran and the countries covered by The World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean, it is recommended that the combination of morphological, molecular, and field epidemiological data can provide practical solutions for vector control programs. Obviously, none of these data exclusively respond to the needs of the mentioned programs. Furthermore, the coordination, design, implementation, and evaluation of applied projects, as well as executive actions, are necessary for the success of these programs regarding the elimination and eradication of malaria and other vector-borne diseases.

Keywords: *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae*, Morphological identification, Molecular taxonomy, Phylogenetics

► **Citation:** Asadi Saatlou Z, Dinparast Djadid N, Raeghi S, Maleki-Ravasan N, Gholizadeh S. Morphological Characteristics and Molecular Markers in Identification of *Anopheles gambiae* Complex and *Anopheles stephensi* Members as Main Malaria Vectors in Africa and Asia. Journal of Health Research in Community. Autumn 2018;4(3): 42-55.

مقاله مروری

مروری بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و مارکرهای مولکولی در شناسایی اعضای کمپلکس آنوفل گامبیه و آنوفل استفنسی ناقلين اصلی مalaria در آسیا و آفریقا

چکیده

مقدمه و هدف: مalaria ای انسانی یکی از بیماری‌های منتقل‌شونده توسط حشرات است که انتشار وسیعی در سطح جهانی دارد. تلاش‌های بسیاری در جهت کنترل و حذف ناقلين این بیماری صورت گرفته است. *An. stephensi* و *An. gambiae* ناقلين اصلی این بیماری در دو قاره آسیا و آفریقا هستند. شایان ذکر است که اعضای کمپلکس گامبیه دارای گونه‌های ناقل و غیرناقل می‌باشد. آنوفل استفنسی نیز دارای سه فرم بیولوژیک است که از ظرفیت انتقال متفاوتی برخوردار هستند. این تبع فوتیپی و ژنوتیپی، شناسایی جمعیت‌های ناقل و به تبع آن پایش و کنترل بیماری مalaria را دشوارتر نموده است. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف مقایسه ویژگی‌های تشخیصی مورفولوژیکی و مولکولی در دو گونه مهم ناقل Malaria در دو قاره جهان (آسیا و آفریقا) انجام شد.

روش کار: پس از جستجو، مطالعه و دسته‌بندی مقالات مرتبط با موضوع مورد بحث، مقایسه دو گونه *An. gambiae* و *An. stephensi* براساس ویژگی‌های مورفولوژیک و مولکولی انجام شد. برای مقایسه مورفولوژیکی از کلیدهای مورفولوژیک جداگانه معرفی شده برای دو گونه، نمونه‌های موجود در انسکتاریوم داشتگاه علوم پزشکی ارومیه و نمونه‌های موجود در انسکتاریوم ملی انتستیتو پاستور ایران استفاده گردید. برای مقایسه مولکولی دو گونه نیز تمامی توالی‌های موجود از پنج مارکر مولکولی Cytochrome c (COI)، Cytochrome c Oxidase II (COII)، Cytochrome c (COI)، Cytochrome c Oxidase II (COII)، Odorant-binding protein (OBP1) و Internal Transcribed Spacer2 (ITS2)، (Domain 3) D3 (Oxidase I) و Proteins در بانک ژنهای ژن استخراج شدند و با استفاده از نرم‌افزارهای بیانفورماتیک آنالیز گردیدند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که تعداد ریچ‌های روی تخم *An. stephensi* از *An. gambiae* بیشتر می‌باشد؛ اما برخلاف *An. stephensi*، تعداد ریچ‌ها در *An. gambiae* صفت تشخیصی برای جداسازی کمپلکس آن محسوب نمی‌شوند. در مقایسه لاروهای دو گونه، چهار ویژگی در بالغین، سه ویژگی متفاوت وجود داشت. علاوه بر این، تمامی مارکرهای مولکولی به خوبی توئنستند دو گونه را زیکدیگر تفکیک کنند؛ اما مارکرهای D3 و ITS2 و OBP1 برای مقایسه‌های بین گونه‌ای و COII و COI در مقایسه‌های درون گونه‌ای ارجح تر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: استفاده تلقیقی از روش‌های تشخیصی سنتی و روش‌های مولکولی جدید می‌توانند همزمان در تفکیک بین گونه‌ای استفاده شوند؛ از این رو در راستای برنامه حذف malaria در ایران و کشورهای تحت پوشش دفتر منطقه‌ای مدیرانه شرقی سازمان جهانی بهداشت توصیه می‌گردد با استفاده از تلقیق داده‌های مورفولوژیکی، مولکولی و اپیدمیولوژی میدانی، راه کارهایی عملی را برای برنامه‌های کنترل ناقلين ارائه داد. بدیهی است که هیچ کدام از این داده‌ها به تهایی پاسخگوی نیازهای برنامه کنترل ناقلين نبوده و هماهنگی طراحی، اجرا و ارزیابی طرح‌های تحقیقاتی کاربردی و اقدامات اجرایی برای موفقتی حذف و ریشه کنی malaria و دیگر بیماری‌های ناقل زاد مورد نیاز می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنوفل استفنسی، آنوفل گامبیه، تاکزونومی مولکولی، تشخیص مورفولوژیک، فیلوزنیک

- ۱. زهراء اسدی ساعتلو^{۱,۲}
- ۲. نوید دین پرست جدید^۲
- ۳. صابر رائقی^۳
- ۴. ناصح ملکی رواسان^۴
- ۵. صابر قلیزاده^۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلين، مرکز تحقیقات سلوی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی و مبارزه با ناقلين، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استاد حشره‌شناسی پزشکی مولکولی، انسکتاریوم ملی، انتستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴. استادیار انکل شناسی پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی مراغه، مراغه، ایران
۵. دانشیار، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلين، مرکز تحقیقات سلوی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۶. دانشیار، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلين، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

* نویسنده مسئول: صابر قلیزاده، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلين، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

Email: sabergholizadeh@yahoo.com,
saber@umsu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۳۰

مقدمه

مالاریا یکی از شاخص‌ترین بیماری‌های انگلی بوده و دارای قدمتی طولانی می‌باشد [۱]. این بیماری توسط تک‌یاخته

بیماری‌زایی از جنس پلاسمودیوم ایجاد شده و توسط پشه آنوفل ماده منتقل می‌گردد. براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO: World Health Organization) در سال ۲۰۱۶، بروز مalaria نسبت به سال ۲۰۰۰ به میزان ۴۱ درصد کاهش داشته و در ۱۷ کشور این بیماری حذف شده است؛ اما هنوز چالش‌های مهمی وجود دارد [۳]. از سوی دیگر، در جنگ‌های بیولوژیکی از مalaria به عنوان یک بیماری تأثیرگذار و از ناقل آن به عنوان یک پتانسیل قوی در انتقال عوامل عفونی یاد می‌گردد؛ از این رو مalaria بیش از هر بیماری دیگری روند و نتیجه جنگ را تحت تأثیر قرار داده و به عنوان یک ابزار بیولوژیکی در جنگ‌ها مطرح می‌باشد [۴]. بر این اساس با مشارکت کارکنان ارتش، ایالات متحده در کنترل بیماری مalaria به نتایج علمی و پیشرفت‌های پژوهشی دست یافته است

یاد می‌گردد؛ از این رو مalaria بیش از هر بیماری دیگری روند و نتیجه جنگ را تحت تأثیر قرار داده و به عنوان یک ابزار بیولوژیکی در جنگ‌ها مطرح می‌باشد [۴]. بر این اساس با مشارکت کارکنان ارتش، ایالات متحده در کنترل بیماری مalaria به نتایج علمی و پیشرفت‌های پژوهشی دست یافته است

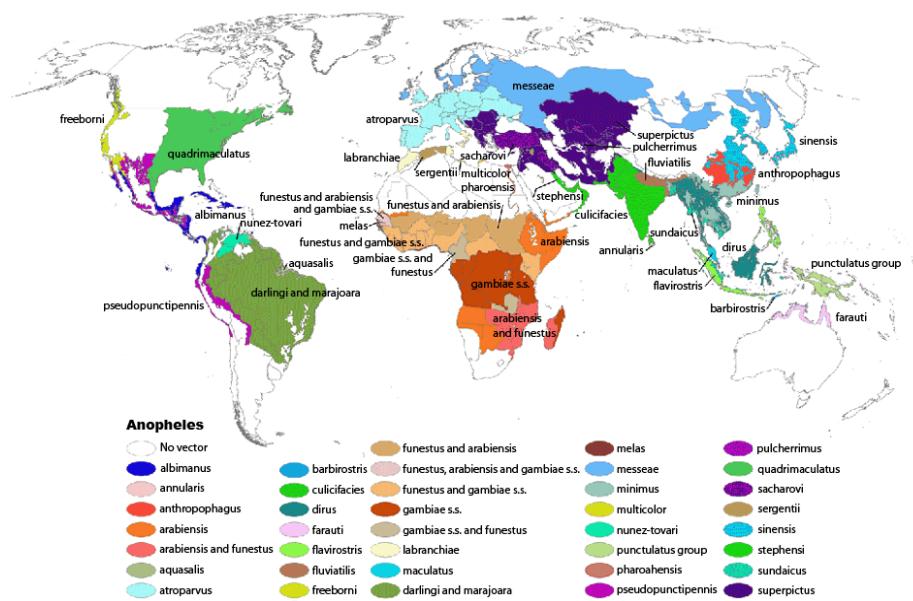
یاد می‌گردد؛ از این رو مalaria بیش از هر بیماری دیگری روند و نتیجه جنگ را تحت تأثیر قرار داده و به عنوان یک ابزار بیولوژیکی در جنگ‌ها مطرح می‌باشد [۴]. بر این اساس با مشارکت کارکنان ارتش، ایالات متحده در کنترل بیماری مalaria به نتایج علمی و پیشرفت‌های پژوهشی دست یافته است

یاد می‌گردد؛ از این رو مalaria بیش از هر بیماری دیگری روند و نتیجه جنگ را تحت تأثیر قرار داده و به عنوان یک ابزار بیولوژیکی در جنگ‌ها مطرح می‌باشد [۴]. بر این اساس با مشارکت کارکنان ارتش، ایالات متحده در کنترل بیماری مalaria به نتایج علمی و پیشرفت‌های پژوهشی دست یافته است

یاد می‌گردد؛ از این رو مalaria بیش از هر بیماری دیگری روند و نتیجه جنگ را تحت تأثیر قرار داده و به عنوان یک ابزار بیولوژیکی در جنگ‌ها مطرح می‌باشد [۴]. بر این اساس با مشارکت کارکنان ارتش، ایالات متحده در کنترل بیماری مalaria به نتایج علمی و پیشرفت‌های پژوهشی دست یافته است

یاد می‌گردد؛ از این رو مalaria بیش از هر بیماری دیگری روند و نتیجه جنگ را تحت تأثیر قرار داده و به عنوان یک ابزار بیولوژیکی در جنگ‌ها مطرح می‌باشد [۴]. بر این اساس با مشارکت کارکنان ارتش، ایالات متحده در کنترل بیماری مalaria به نتایج علمی و پیشرفت‌های پژوهشی دست یافته است

یاد می‌گردد؛ از این رو مalaria بیش از هر بیماری دیگری روند و نتیجه جنگ را تحت تأثیر قرار داده و به عنوان یک ابزار بیولوژیکی در جنگ‌ها مطرح می‌باشد [۴]. بر این اساس با مشارکت کارکنان ارتش، ایالات متحده در کنترل بیماری مalaria به نتایج علمی و پیشرفت‌های پژوهشی دست یافته است



شکل ۱: توزیع جهانی ناقلين مalaria [۱۴]

نیز اينکه هر دو از زيرجنس Cellia میباشند، در اين مطالعه ویژگی های مورفولوژیکی و مولکولی اين دو ناقل با يكديگر مقایسه شده و صفات مورد استفاده برای شناسایی آنها تفکیک گردیده است.

روش کار

در اين مطالعه برای مقایسه اين دو گونه (*An. gambiae* و *An. stephensi*) ابتدا مقالاتی از پاپکاههای اطلاعاتی Proquest، Google Scholar، Scopus، PubMed، Direct Irandoc، Magiran، Iranmedex، SID و اطلاعاتی پاپکاههای شناسنامه مازندران، پاییز ۱۳۹۷، دوره ۴، شماره ۳، ۵۵-۶۴

ذکر اين نکته ضرورت دارد که فرم *An. stephensi* type در *An. stephensi intermediat* در نواحی شهری، *An. stephensi mysorensis* در نواحی روستایی پراکنده میباشد [۲۸-۲۶].

يکی از مهمترین اقدامات برای کنترل مalaria، مبارزه با پشه های آنوفل است که در کوتاه ترین زمان ممکن، بیشترین عواید را به بیشترین افراد در یک جامعه ارائه میکند. مطابق با استراتژی ملی کنترل مalaria، کنترل ناقلين به عنوان اصلی ترین راه برای کاهش انتقال Malaria در سطح جامعه پس از درمان دارویی افراد مبتلا در اولویت دوم قرار میگیرد. کنترل پشه های ناقل شامل مراحل بالغ و نابالغ آنها میشود. يکی از مهمترین زمینه های کاری در این اقدام، شناسایی دقیق ناقلين با استفاده از روش های مورفولوژیکی ستی و روش های ژنتیکی جدید است. با توجه به اهمیتی که این دو ناقل در دو قاره آسیا و آفریقا دارند و به عنوان ناقلين اصلی Malaria در دو قاره محسوب میشوند و

MEGA7 بهره گرفته شد.

یافته‌ها

پایه شناسایی موفولوژیکی گونه‌ها براساس ویژگی‌های ظاهری موجود در مراحل زندگی می‌باشد. شباهت‌ها و تفاوت‌های ظاهری براساس مطالعات مورفولوژیکی در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسه مورفولوژی تخم نشان می‌دهد که تفاوت مهم در تخم‌های این دو گونه تنها براساس تعداد ریچهای موجود بر روی تخم بوده و در *An. gambiae*, *An. stephensi* از *An. stephensi* بر خلاف *An. gambiae* مورفولوژی تخم صفت تشخیصی برای تفکیک کمپلکس *An. gambiae* محسوب نمی‌شود. مهم‌ترین ویژگی‌ها در تشخیص لاروهای دو گونه از یکدیگر، ابریشم‌های جانبی مزوتوراکس، پایه ابریشم‌های جانبی و پایه ابریشم نشانه پروتوراکس (P-1) می‌باشند (شکل ۲).

ویژگی کلیدی در تشخیص مرحله بالغ *An. stephensi* وجود لکه‌های روشن بر روی ران و ساق پا است که این ویژگی در *An. gambiae* نیز مشاهده می‌شود. در مطالعه حاضر برای بالغین این دو گونه، وجود یا عدم وجود لکه روشن منقطع در سومین ناحیه تیره رگبال جلویی مشاهده گردید (شکل ۳).

بر مبنای نتایج، سایز توالی کامل *ITS2* در *An. gambiae* معادل bp ۴۳۱-۴۳۲ و در *An. stephensi* bp ۴۶۸-۴۶۹ با *An. stephensi* می‌باشد. بر این اساس با درنظر گرفتن این اختلاف سایز می‌توان این ناقلين را از یکدیگر جدا کرد. اختلاف مشاهده شده در توالی‌های *JTS2* و *An. gambiae* در *An. stephensi* در جدول ۲ نشان داده شده است. درخت فیلوزنی رسم شده از توالی‌های ۴ قابل مشاهده می‌باشد. براساس این مارکر، دو گونه به همراه کمپلکس *An. gambiae* به صورت جداگانه دسته‌بندی

Molecular Markers و Keys Distribution Molecular Identification استفاده شد. مقالات جمع‌آوری شده ابتدا براساس نام گونه، سپس بر مبنای نوع مقایسه مورفولوژیکی یا مولکولی و در ادامه براساس موضوعاتی چون مراحل زندگی و نوع مارکرهای مربوط به شناسایی مولکولی گونه‌ها دسته‌بندی شدند.

به منظور انجام این پژوهش ابتدا براساس مراحل زندگی، مطالعه مورفولوژیک دو گونه در مراحل تخم، لارو و بالغ انجام شد و مقالات و کلیدهای تشخیصی موجود برای هر گونه استخراج گردید، دسته‌بندی شد و به صورت مقایسه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. باید خاطرنشان ساخت که در کلیدهای مورفولوژیک، برخی از ویژگی‌ها وجود داشتند که در کلید هر دو گونه به آن‌ها اشاره شده بود؛ اما برخی از ویژگی‌های *An. stephensi* در کلید تشخیصی *An. gambiae* کاربرد نداشتند؛ از این رو برای بررسی و مقایسه از نمونه‌های موجود در موزه دانشکده بهداشت، انسکتاریوم دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و همچنین نمونه‌های موجود در انسکتاریوم ملی بخش مطالعات مالاریا و ناقلين انتستیو پاستور ایران استفاده شد. در این مطالعه در مرحله تخم یک ویژگی، در مرحله لاروی نه ویژگی و در مرحله بالغ هفت ویژگی مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این برای مقایسه مولکولی، توالی ژن‌های موجود از هر مارکر مولکولی از بانک جهانی ژن جمع‌آوری Cytochrome (COI) گردید. برای این کار از کلمات کلیدی *ITS2*, (Cytochrome c Oxidase II) *COII*, (c Oxidase I Domain 3) *D3*, (Internal Transcribed Spacer2) (Odorant-binding Proteins) *OBPI* استفاده شد. لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر از پنج مارکر مولکولی برای مقایسه این دو گونه آنوفل استفاده گردید که رایج‌ترین آن‌ها عبارت بودند از: *JTS2*, *COI*, *D3*, *OBPI* و *COII*. برای یکسان‌سازی سکانس و توالی‌ها نیز از نرم‌افزار آنلاین Bioedit و MultAlin استفاده شد. همچنین، به منظور آنالیزهای فیلوزنیکی از نرم‌افزار

جدول ۱: مقایسه مورفولوژیکی گونه‌های *An. stephensi* و *An. gambiae* در مراحل مختلف زندگی

<i>An. stephensi</i>	<i>An. gambiae</i>	مرحله
۲۲-۹	۳۰-۲۵	تخم (ریچ‌های روی تخم)
کلیپتال‌های داخلی از یکدیگر فاصله دارند.	a کلیپتال‌های داخلی از یکدیگر فاصله دارند.	
کلیپتال‌های داخلی یا ساده هستند و یا انشعاب جزئی آن‌ها محدود به نصف کلیپتال می‌باشد.	b کلیپتال‌های داخلی یا ساده هستند و یا انشعاب جزئی آن‌ها محدود به نصف کلیپتال می‌باشد.	
ساده بوده و گاهی اوقات کمی در قسمت نوک منشعب شده‌اند.	c کلیپتال‌های خارجی با ساده هستند و یا کمتر از هشت انشعاب دارند.	
9M منشعب بوده و 10M ساده می‌باشد.	d ابریشم‌های جانبی مزوتوراکس 9M و 10M هر دو ساده هستند.	
پایه توبرکل این ابریشم به خوبی اسکلروتیزه شده است.	e ابریشم نشانه پروتوراکس P-1 به طور ناچیزی رشد کرده و پایه توبرکل آن با بسیار کوچک بوده و یا موجود نمی‌باشد.	لارو
موی Saddle ساده است.	f موی Saddle یا موی دمی ساده دارای ۲-۴ انشعاب می‌باشد.	
اطراف بندهای شکمی و قفسه سینه فاقد Spicules یا خار است.	g اطراف بندهای شکمی و قفسه سینه فاقد Spicules یا خار است.	
پنهانی آن بیشتر از نصف فاصله بین ابریشم‌های پنجهای نمی‌باشد.	h پنهانی ترکال پلیت شکمی حدود ۲/۳ فاصله بین ابریشم‌های پنجهای می‌باشد.	
کوچک و گرد می‌باشد.	i پایه ابریشم‌های جانبی ۹-۱۲ بزرگ، نوک تیز و خمیده است.	
رگبال جلویی بال حداقل چهار لکه تیره یا روشن دارد.	a رگبال جلویی بال حداقل چهار لکه تیره یا روشن دارد.	
پaha دارای لکه‌های روشن هستند.	b پaha دارای لکه‌های روشن هستند.	
بندهای ۸-۲ شکمی پوشیده از فلس‌های روشن می‌باشند.	c بندهای هفت و هشت شکمی تنها دارای فلس‌های روشن می‌باشند.	
پالپ‌ها با چهار باند روشن هستند که باند انتهایی نوک آن‌ها واضح‌تر می‌باشد.	d پالپ‌ها دارای سه یا چهار باند روشن هستند	بالغ
سومین ناحیه تیره رگبال دارای یک لکه منقطع تیره می‌باشد.	e سومین ناحیه تیره رگبال دارای یک لکه منقطع تیره می‌باشد.	
بندهای ۱-۴ پنجهای پا در انتهای هر بند دارای لکه روشن هستند.	f بندهای ۱-۴ پنجهای پا در انتهای هر بند دارای لکه روشن هستند.	
در فرانزهای منتهی رگبال‌ها لکه‌های روشن وجود دارد.	f در فرانزهای منتهی به رگبال‌ها، لکه‌های روشن وجود دارد.	

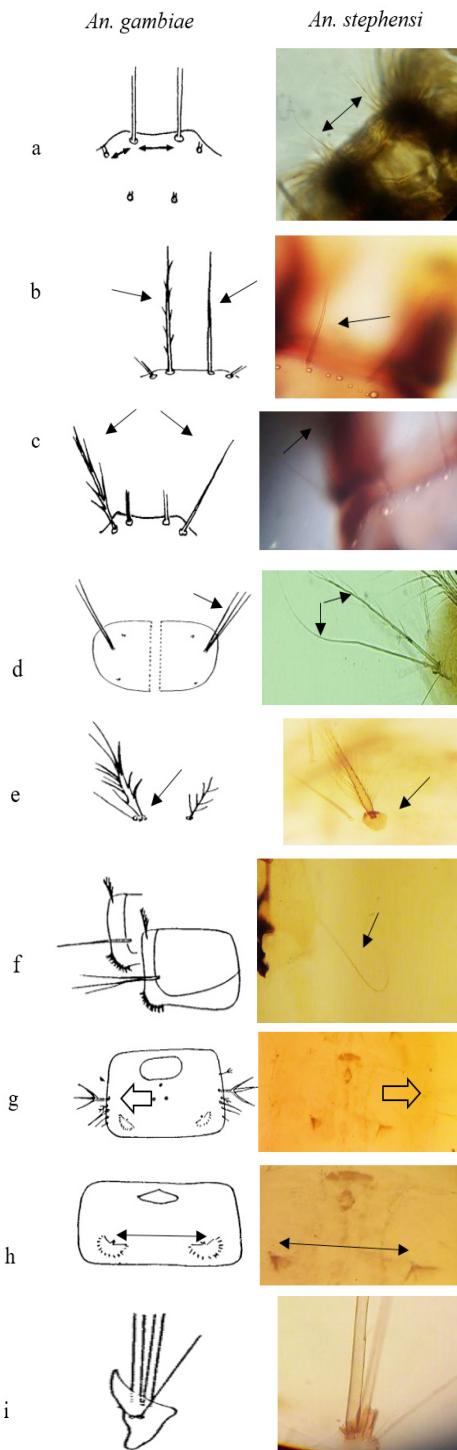
آنوفل *An. stephensi* قرار گرفت. در درخت فیلوژنی رسم شده براساس توالی‌های COI در *An. stephensi* و *An. gambiae* دو گونه در دو شاخه جداگانه قرار گرفتند. علاوه بر این، *An. stephensi* در سه زیرشاخه مجزا جای گرفت. باید خاطرنشان ساخت که تفکیک گونه‌ها در *An. gambiae* به خوبی صورت نگرفته است؛ برای مثال دو توالی از *An. bwambae* به صورت جدا از یکدیگر

می‌شوند. گونه‌هایی مانند *An. arabiensis* و *An. bwambae* در شاخه‌ای جدا از *An. gambiae* قرار می‌گیرند. باید توجه داشت که مارکر ITS2 نتوانسته است فرم‌های بیولوژیک *An. stephensi* را از یکدیگر تفکیک نماید. ذکر این نکته ضرورت دارد که یک توالی از *An. stephensi* (به شماره HQ703001) که با *An. stephensi* حدود ۱۳-۱۴ درصد اختلاف را نشان می‌داد، در درخت فیلوژنی در شاخه‌ای جداگانه از توالی‌های

بوده و توالی‌های *An. arabiensis* در میان توالی‌های *An. gambiae* قرار گرفته‌اند. تفاوت‌های بین و داخل گونه‌ای براساس مارکرهای مولکولی مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

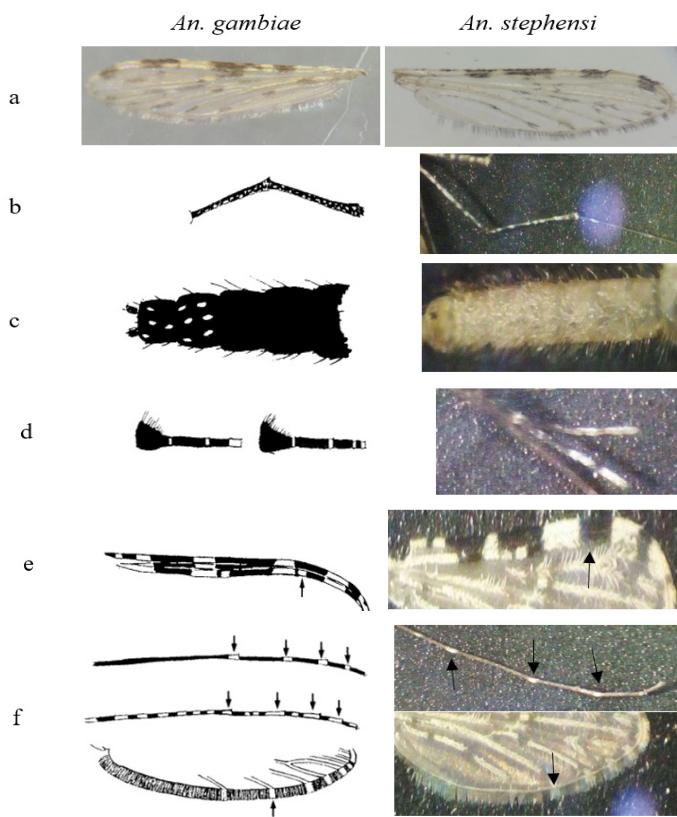
درخت فیلوزنی رسم شده از توالی‌های دو گونه براساس *COII* نشان داد که این مارکر می‌تواند دو گونه را به خوبی از یکدیگر جدا کند و توالی‌های *An. stephensi* را در سه گروه مجزا دسته‌بندی نماید (شکل ۵). در این مرحله در مجموع، ۸۳ توالی از بانک جهانی ژن تحت عنوان *An. gambiae D3* و *An. stephensi* استخراج شد که سه توالی آن به دلیل سایز کوچک مورد استفاده قرار نگرفت. لازم به ذکر است که از اعضای کمپلکس *An. gambiae* تنها توالی مربوط به *An. arabiensis* و *An. gambiae* بود. باید عنوان نمود که نمونه‌های *An. gambiae* از آنگولا در قاره آفریقا و نمونه‌های *An. stephensi* از شبه قاره هند و چین جمع‌آوری گردیدند. مقایسه توالی‌ها نشان داد که بین توالی‌های *An. gambiae* حدود ۰-۰/۲۶ درصد، بین توالی‌های *An. stephensi* حدود ۰-۱/۵۳ درصد و بین توالی‌های دو گونه با یکدیگر به طور میانگین ۱۷ درصد اختلاف وجود دارد. از سوی دیگر، در این مطالعه سایز توالی‌ها در *An. gambiae* معادل ۳۹۲-۳۹۴ bp و در *An. stephensi* معادل ۳۸۳ bp بود. به دست آمد.

درخت فیلوزنی که با استفاده از توالی *D3* در *An. gambiae* و *An. stephensi* رسم شد، نشان داد که این مارکر می‌تواند دو گونه را به خوبی از یکدیگر مجزا کند و در دو شاخه جداگانه قرار دهد؛ اما نمی‌تواند اعضای درون گونه را تفکیک نماید (شکل ۶). از سوی دیگر، درخت فیلوزنی دیگری براساس توالی اینtron ناحیه *OBP1* رسم گردید که علاوه بر جداسازی دو گونه از یکدیگر، *An. stephensi* را در سه گروه مجزا قرار داد (شکل ۷).



شکل ۲: مقایسه ویژگی‌های مورفولوژیکی مرحله لاروی *An. gambiae* و *An. stephensi*

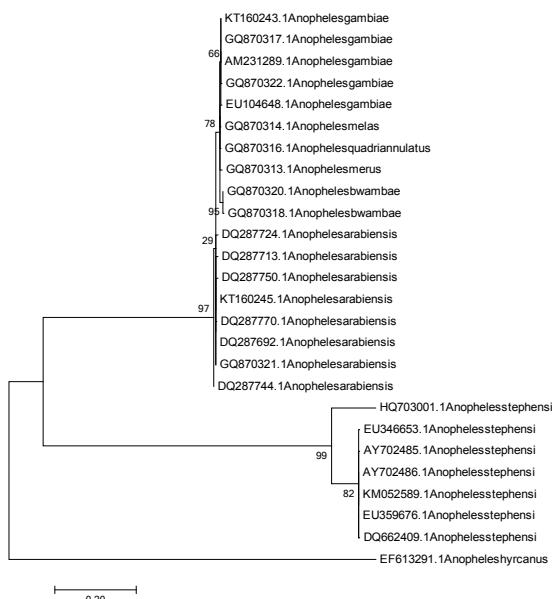
* حروف a تا i منطبق بر ویژگی‌های ارائه شده در جدول ۱ می‌باشند.



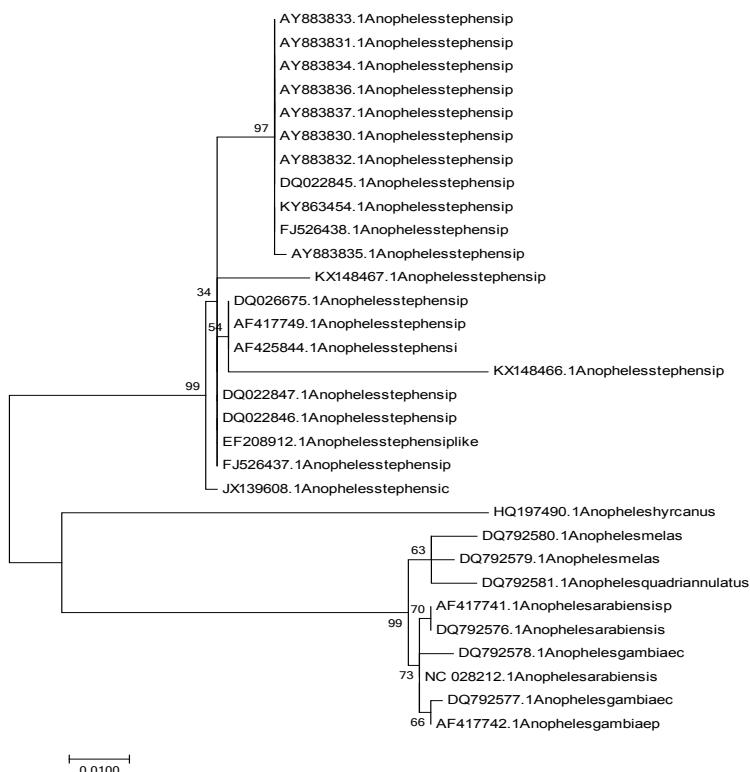
شکل ۳: مقایسه ویژگی‌های مورفولوژیکی بالغ *An. gambiae* و *An. stephensi*
* حروف a تا f منطبق بر ویژگی‌های ارائه شده در جدول ۱ می‌باشند.

جدول ۲: تفاوت‌های ژنتیکی گونه‌های *An. stephensi* و *An. gambiae* براساس مارکرهای مولکولی مختلف

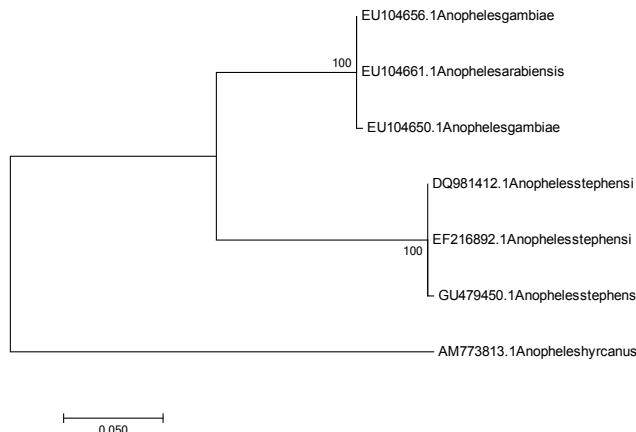
مارکر مولکولی	اختلاف داخل گونه (درصد)	تعداد توالی‌های مورد بررسی	اختلاف بین دو گونه (درصد)	Insertion	Deletion	Transition	Transversion
<i>An. gambiae</i> ITS2	۰/۳-۰/۲	۲۹۶	۴۷/۳۳	.	۱	۴۵	۱۶
	۳-۰			۴	۱	۸	۸
<i>An. gambiae</i> COI	۰/۰-۰/۶۴	۱۵۹	۱۱/۵	.	۱	۳۴	۱۱
	۲-۰/۰۵			.	.	۱۶	۱
<i>An. gambiae</i> COII	۰/۱۶-۱/۶۶	۳۰	۱۱/۳	.	۱۱	۱۷	۳
	۶-۰/۹۴			۶	۱۱	۲۶	۱۹
<i>An. gambiae</i> D3	۰-۰/۲۶	۸-	۱۷	.	.	۰	۱
	۰/۱-۰/۵۳			.	۲	۳	۳
<i>An. gambiae</i> OBP1	-		۴۶	-	-	-	-
	۰/۲-۰/۶۲			.	۱۹	۵	۲۴



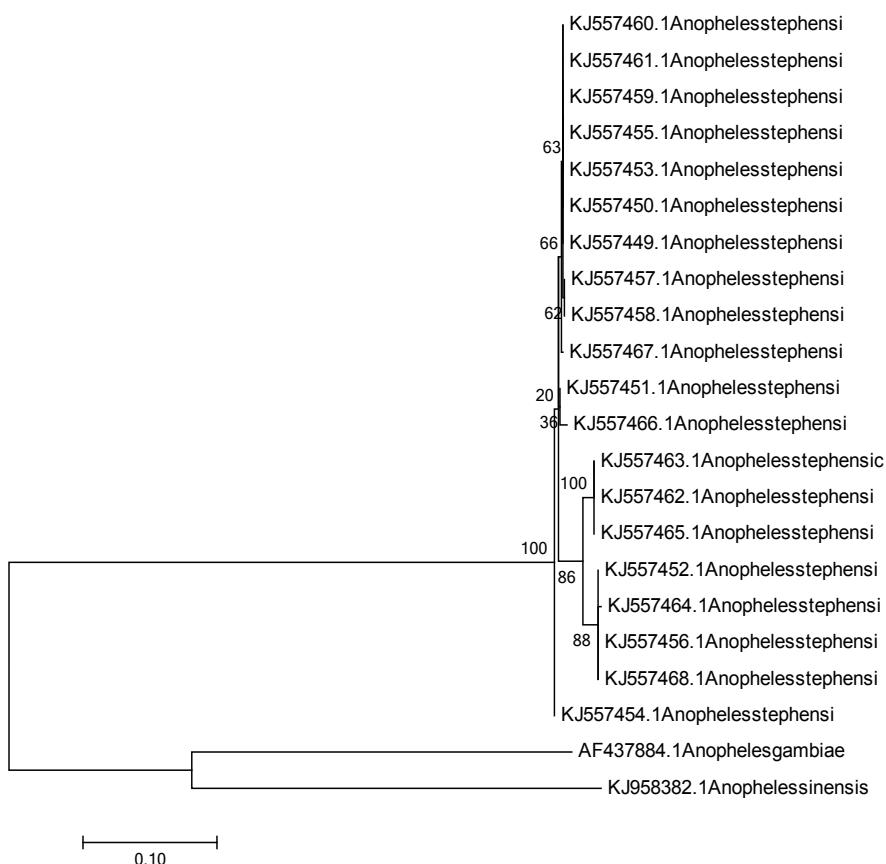
شکل ۴: درخت فیلوزنیک آنوفل استفنسی و آنوفل گامبیه از مطالعات مختلف انجام شده براساس توالی ITS2 با مدل Kimura2-parameter بر پایه Maximum Likelihood



شکل ۵: درخت فیلوزنیک آنوفل استفنسی و آنوفل گامبیه از مطالعات مختلف انجام شده براساس ژن COII با مدل Kimura2-parameter بر پایه Maximum Likelihood



شکل ۶: درخت فیلوجنتیک آنوفل استفنسی و آنوفل گامبیه از مطالعات مختلف انجام شده براساس ژن *D3* با مدل Kimura2-parameter Maximum Likelihood



شکل ۷: درخت فیلوجنتیک آنوفل استفنسی و آنوفل گامبیه از مطالعات مختلف انجام شده براساس ژن *OBPI* با مدل Kimura2-parameter Maximum Likelihood

بحث و نتیجه‌گیری

گونه بهره گرفته شده است [۳۲، ۳۱، ۱۱].

آنالیز مولکولی توالی *An. gambiae* s.s در غرب

آفریقا جهت بررسی فرم‌های کروموزومی S و M در دو منطقه ساوانا و باماکو نشان داد که *An. gambiae* یک گونه ساده نمی‌باشد [۳۳]. آنالیز *ITS2* و RAPD در جمعیت *An. stephensi* در ایران نیز گویای آن بود که این گونه در ایران می‌تواند یک گونه با فرم‌های بیولوژیکی و اکولوژیکی مختلف در مناطق زئوجغرافیایی متفاوت باشد [۳۴]. در این مطالعه درخت فیلوجنی رسم شده از توالی‌های *An. stephensi* و *An. gambiae* بر پایه مارک *ITS2* نشان داد که این مارک می‌تواند کمپلکس *An. gambiae* و *An. arabiensis* را به صورت جداگانه دسته‌بندی نموده و گونه‌هایی مانند *An. bwambae* از یکدیگر تفکیک نمی‌گردند. فرم‌های بیولوژیکی *An. stephensi* از *An. stephensi* دو فرم بیولوژیکی *An. stephensi* از سوی دیگر، شناسایی دو فرم بیولوژیکی *An. stephensi* type *mysorensis* و *An. stephensi* type *COI* در مناطق مختلف شبه قاره هند با استفاده از دو مارک *ITS2* و *D3* نشان از آن داشت که این توالی‌ها در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه یکسان بوده و این مارک‌ها قادر به جداسازی این دو فرم نمی‌باشند [۳۵]. علاوه‌بر این، استفاده از توالی‌های *An. gambiae*, *An. funestus* و *D3* در *COI*, *ITS2* و *An. rivulorum* نشان داد که در توالی‌های *COI*, گونه‌های *An. gambiae* s.l به صورت یکسان طبقه‌بندی شده‌اند؛ در حالی که در توالی‌های *ITS2*, تفاوت‌هایی در طبقه‌بندی مشاهده می‌گردد [۳۶]. در این راستا، آنالیز توالی‌های *An. stephensi* *COII* و *COI* در ایران نشان‌دهنده آن بود که به غیر از تعداد کمی جایگزینی در توالی‌های *COII*, تمامی فرم‌های بیولوژیکی و جمعیت‌ها بسیار نزدیک به یکدیگر بوده و این توالی‌ها در جمعیت‌های مختلف این گونه بسیار شبیه به *COI* یکدیگر می‌باشند [۳۷]. در این ارتباط در بررسی مولکولی *An. stephensi* در کشور پاکستان، هیچ گونه اختلاف بر روی

در مطالعات حشره‌شناسی استفاده از روش‌های مورفو‌لولژیکی مرسوم می‌باشد. در پژوهش حاضر سه مرحله زندگی این حشره در اختلافات بین گونه‌ای آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه مورفو‌لولژی تخم نشان می‌دهد که مورفو‌لولژی تخم، صفت تشخیصی برای تفکیک کمپلکس *An. gambiae* محسوب نمی‌شود. مطالعات بسیار محدودی در ارتباط با مورفو‌لولژی تخم هر دو آنوفل انجام شده است. بر مبنای مطالعات، قسمت جلویی تخم *An. gambiae* عریض‌تر از قسمت پشتی بوده و تعداد ریچ‌های روی تخم ۲۹-۳۰ عدد گزارش شده است [۲۹]. از سوی دیگر، *An. stephensi* بر اساس ریچ‌های روی تخم به سه فرم تقسیم‌بندی می‌شود که تعداد ریچ‌های موجود در فرم *intermediate type* حدود ۲۲-۱۶ مورد، تعداد ریچ‌ها در فرم *mysorensis* حدود ۹-۷ مورد و در فرم *An. stephensi* بین ۱۵-۲۷ مورد است [۲۸]. به نظر می‌رسد استفاده از ویژگی‌های مورفو‌لولژیک در مراحل لاروی و بالغ دو گونه در تفکیک آن‌ها کاملاً کاربردی می‌باشد.

استفاده از مارک‌های ژنتیکی در تفکیک ناقلين مالاريا از اهمیت بالایی برخوردار است. استفاده از سوم، جهش ژنتیکی و مهاجرت ژنی می‌تواند تأثیر مستقیمی بر شناسایی نمونه داشته باشد. با توجه به ماهیت ژن‌های هسته‌ای و میتوکندریایی، استفاده از هر کدام از آن‌ها در تشخیص (با توجه به اهداف مطالعه) اهمیت دارد. شایان ذکر است که مقایسه همزمان دو گونه *An. gambiae* و *An. stephensi* تاکنون انجام نشده و از این مارک تنها برای شناسایی و مطالعه ژنتیک جمعیت یکی از این دو گونه استفاده گردیده است. مارک *ITS2* یکی از مارک‌های مولکولی رایج می‌باشد که از آن برای مطالعه فیلوجنتیک آنوفلهای ایران استفاده شده است [۳۰]. باید عنوان نمود که از این مارک مولکولی برای شناسایی اعضای این دو

مناسب باشد؛ اما در مطالعات ژنتیک، جمعیت داخل گونه‌ای مارکرهای مولکولی مانند *COII* و *OBP1* کارایی بهتری دارند؛ از این رو در راستای برنامه حذف مalaria در ایران و کشورهای تحت پوشش دفتر منطقه‌ای مدیترانه شرقی سازمان جهانی بهداشت، استفاده از روش‌های جدید آنالیز مولکولی توصیه می‌گردد تا با تلفیق داده‌های مورفولوژیکی، مولکولی و اپیدمیولوژی میدانی بتوان راه کارهایی عملی برای برنامه‌های کنترل ناقلین را ارائه داد. بدینه است که هیچ‌یک از این داده‌ها به تنهایی پاسخگوی نیازهای برنامه کنترل ناقلین نبوده و همان‌گونه طراحی، اجرا و ارزیابی طرح‌های تحقیقاتی کاربردی و اقدامات اجرایی، لازمه موفقیت حذف و ریشه‌کنی Malaria و دیگر بیماری‌های ناقل زاد می‌باشد.

قدردانی

بدین‌وسیله نویسنده‌گان این مقاله از حمایت‌های مرکز تحقیقات سلوی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (طرح شماره ۲۴۴۰) و انسکتاریوم ملی گروه تحقیقات Malaria و ناقلین انسستیتو پاستور ایران قدردانی می‌نمایند.

ژنتیکی بین جمعیت‌ها مشاهده نشد [۳۸]. درخت فیلوژنی که با استفاده از توالی *D3* در *An. stephensi* و *An. gambiae* در این مطالعه رسم گردید، نشان داد که این مارکر می‌تواند دو گونه را به خوبی از یکدیگر مجزا کند و در دو شاخه جداگانه قرار دهد؛ اما نمی‌تواند اعضای درون گونه را مجزا نماید.

آخرًا از توالی ناحیه اینtron ۱ OBP در *An. stephensi* به عنوان مارکر مولکولی برای شناسایی و تفکیک فرم‌های بیولوژیک این گونه استفاده شده است [۳۹]. درخت فیلوژنی براساس توالی این مارکر نشان داد که علاوه بر جداسازی دو گونه، تفاوت‌های درون گونه‌ای *An. stephensi* در سه گروه مجزا جای گرفته‌اند؛ اما به دلیل اینکه تنها یک توالی از *An. gambiae* در بانک جهانی ژن موجود بود، نمی‌توان در مورد کارایی آن در اعضای کمپلکس *An. gambiae* اظهار نظر نمود.

به نظر می‌رسد که استفاده تلفیقی از روش‌های مختلف تشخیصی (چه به صورت سنتی و چه با استفاده از روش‌های مولکولی و مارکرهای جدید) می‌تواند در تفکیک بین گونه‌ای مورد استفاده قرار گیرد. در تفکیک گونه‌های آنوفل، استفاده از مارکرهای هسته‌ای مانند *ITS2* و *D3* به دلیل داشتن نواحی کمتر تغییرپذیر در طولانی مدت می‌تواند برای تفکیک بین دو گونه

References

1. Vernick KD, Waters AP. Genomics and malaria control. N Engl J Med 2004; 351(18):1901-4.
2. Who/Unicef Report: malaria mdg target achieved amid sharp drop in cases and mortality, but 3 billion people remain at risk. Neurosciences 2016; 21(1):87-8.
3. Barber BE, Rajahram GS, Grigg MJ, William T, Anstey NM. World Malaria report: time to acknowledge *Plasmodium knowlesi* malaria. Malar J 2017; 16(1):135.
4. Miller J, Broad WJ, Engelberg S. Germs: biological weapons and America's secret war. New York: Simon and Schuster; 2012.
5. Ockenhouse CF, Sun PF, Lanar DE, Wellde BT, Hall BT, Kester K, et al. Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. J Infect Dis 1998; 177(6):1664-73.
6. Harbach RE, Kitching IJ. The phylogeny of *Anophelinae* revisited: inferences about the origin and classification of Anopheles (Diptera: Culicidae).

- Zoologica Scripta 2016; 45(1):34-47.
7. Service M, Townson H. The *Anopheles* vector. London, UK: Dragana Manestar; 2002. P. 59-84.
 8. Salem OA, Khadijetou ML, Moina MH, Lassana K, Sébastien B, Ousmane F, et al. Characterization of *anopheline* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Nouakchott, Mauritania. J Vector Borne Dis 2013; 50(4):302-6.
 9. Gilles M, De Meillon B. The *Anophelinae* of Africa, south of Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region) Johannesburg. South African: Publications of the South African Institute of Medical Research; 1968.
 10. Coetzee M, Craig M, Le Sueur D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. Parasitol Today. 2000; 16(2):74-7.
 11. Santolamazza F, Della Torre A, Caccone A. A new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method to identify *Anopheles arabiensis* from *An. gambiae* and its two molecular forms from degraded DNA templates or museum samples. Am J Trop Med Hyg 2004; 70(6):604-6.
 12. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 1993; 49(4):520-9.
 13. White GB. Notes on a catalogue of Culicidae of the Ethiopian region. Mosquito Syst 1975; 7:303-44.
 14. Kiszewski A, Mellinger A, Spielman A, Malaney P, Sachs SE, Sachs J. A global index representing the stability of malaria transmission. Am J Trop Med Hyg 2004; 70(5):486-98.
 15. Mastbaum O. Past and present position of malaria in Swaziland. Am J Trop Med Hyg 1957; 60(5):119-27.
 16. Ribbands CR. Differences between *Anopheles melas* (*A. gambiae* var. *melas*) and *Anopheles gambiae*. I. The larval Pecten. Ann Trop Med Parasitol 1944; 38(2):85-6.
 17. Bruce-Chwatt LJ. Essential malariology. New Hampshire, USA: William Heinemann Medical Books Ltd; 1985.
 18. Krishnan K. *Anopheles stephensi* Liston, 1901. India: Vectors of Malaria in India; 1961.
 19. Manouchehri A, Javadian E, Eshghy N, Motabar M. Ecology of *Anopheles stephensi* Liston in southern Iran. Trop Geogr Med 1976; 28(3):228-32.
 20. Morgan K, O'Loughlin SM, Mun-Yik F, Linton YM, Somboon P, Min S, et al. Molecular phylogenetics and biogeography of the neocellia series of *anopheles* mosquitoes in the oriental region. Mol Phylogenetic Evol 2009; 52(3):588-601.
 21. World Health Organization. Resistance of vectors of disease to pesticides. Fifth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Resistance of vectors of disease to pesticides Fifth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Geneva: World Health Organization; 1980.
 22. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vectors 2010; 3(1):117.
 23. Gakhar SK, Sharma R, Sharma A. Population genetic structure of malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). India: National Institute of Science Communication and Information Resources; 2013.
 24. World Health Organization. Anopheline species complexes in south-east Asia: WHO Regional Offices for South-East Asia New Delhi. Geneva: World Health Organization; 1998.
 25. Sweet W, Rao BA. Races of *A. stephensi* Liston, 1901. Indian Med Gazette 1937; 72(11):665.
 26. Rao TR. The Anophelines of India, Rev. Edn. Delhi: Malaria Research Centre (ICMR); 1984. P. 154-8.
 27. Rutledge LC, Ward RA, Bickley WE. Experimental hybridization of geographic strains of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). Ann Entomol Soc Am 1970; 63(4):1024-30.
 28. Subbarao SK, Vasantha K, Adak T, Sharma V, Curtis C. Egg-float ridge number in *Anopheles stephensi*: ecological variation and genetic analysis. Med Vet Entomol 1987; 1(3):265-71.
 29. Holstein MH. Biology of *Anopheles gambiae* research in French West Africa. Geneva: World Health Organization; 1954.
 30. Gholizadeh S, Djadid ND, Nouroozi B, Bekmohammadi M. Molecular phylogenetic analysis of *Anopheles* and *Cellia* subgenus *anophelines* (Diptera: Culicidae) in temperate and tropical regions of Iran. Acta Trop 2013; 126(1):63-74.
 31. Djadid ND, Gholizadeh S, Aghajari M, Zehi AH, Raeisi A, Zakeri S. Genetic analysis of rDNA-ITS2 and RAPD loci in field populations of the malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): implications for the control program in Iran. Acta Trop 2006; 97(1):65-74.
 32. Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR, Caccone A. Attempts to molecularly distinguish

- cryptic taxa in *Anopheles gambiae* ss. Insect Mol Biol 2001; 10(1):25-32.
33. Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR, Caccone A. Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. Insect Mol Biol 2001; 10(1):25-32.
34. Djadid ND, Gholizadeh S, Aghajari M, Zehi AH, Raeisi A, Zakeri S. Genetic analysis of rDNA-ITS2 and RAPD loci in field populations of the malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): implications for the control program in Iran. Acta Trop 2006; 97(1):65-74.
35. Alam MT, Bora H, Das MK, Sharma YD. The type and mysorensis forms of the *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in India exhibit identical ribosomal DNA ITS2 and domain-3 sequences. Parasitol Res 2008; 103(1):75-80.
36. Norris LC, Norris DE. Phylogeny of *anopheline* (Diptera: Culicidae) species in southern Africa, based on nuclear and mitochondrial genes. J Vector Ecol 2015; 40(1):16-27.
37. Oshaghi M, Yaghoobi F, Vatandoost H, Abai M, Akbarzadeh KJ. *Anopheles stephensi* biological forms, geographical distribution, and malaria transmission in malarious regions in Iran. Pak J Bio Sci 2006; 9(2):294-8.
38. Ali N, Hume JC, Dadzie SK, Donnelly MJ. Molecular genetic studies of *Anopheles stephensi* in Pakistan. Med Vet Entomol 2007; 21(3):265-9.
39. Gholizadeh S, Firoozian S, Ladonni H, Hajipirloo HM, Djadid ND, Hosseini A, et al. The *Anopheles stephensi* odorant binding protein 1 (AsteObp1) gene: a new molecular marker for biological forms diagnosis. Acta Trop 2015; 146:101-13.