تنوع ژنتیکی آنوفل سوپرپیکتوس ناقل بیماری مالاریا درجنوب غرب ایران

زینب برغمدی[۱]، سید حسن موسی کاظمی *[۲]،محمد علی عشاقی[۳] ، حسن وطن دوست[۳] ، عابدین ثقفی‌پور[۴] ، فاطمه محترمی[۱]

۱- کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- دانشیار حشره شناسی پزشکی ، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- استاد حشره شناسی پزشکی ، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران
***نشانی برای مکاتبه:** تهران، میدان انقلاب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین
Moosakazemi@tums.ac.ir

دریافت مقاله بهمن نود و چهار پذیرش برای چاپ: فروردین نود و پنج

چکیده

سابقه و هدف: مالاریا یکی از مهم ترین مشکلات بهداشتی در بسیاری از مناطق جهان است. این بیماری در ۱۰۶ کشور جهان به صورت آندمیک وجود دارد. این مطالعه با هدف تعیین تنوع ژنتیکی آنوفل سوپرپیکتوس به عنوان ناقل مالاریا در جنوب غرب ایران انجام گرفت.

روش کار: در این مطالعه آنوفل سوپرپیکتوس از نواحی مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد در جنوب غرب ایران در سال ۱۳۹۲ صید گردید. سپس ژنوتایپ این گونه با استفاده از تکنیک مولکولی PCR و ژن r DNA ITS2 تکثیر و ارزیابی شد.
یافته ها: آنالیز توالی ژن ITS2 درون و بین جمعیت های آنوفل سوپرپیکتوس تایید نمود که ژنوتایپ X در استان کهگیلویه و بویراحمد دیده می شود. طول قطعه ITS2 در بین جمعیت های این گونه یکسان (448 bp) بود.

نتیجه گیری: بر اساس یافته های این مطالعه که برای اولین بار در استان کهگیلویه و بویرحمد انجام شد آنوفل سوپرپیکتوس در این استان دارای تنوع ژنتیکی بوده است.

واژگان کلیدی: آنوفل سوپرپیکتوس، مالاریا، واکنش های زنجیره ای پلیمراز، ایران

مقدمه

در حال حاضر مالاریا یکی از مهمترین بیماری های عفونی در جنوب، جنوب شرق کشور خصوصاً استان های سیستان و بلوچستان، هرمزگان و جنوب کرمان است(۱). در استان سیستان و بلوچستان بیماری مالاریا ناپایدار است(۲). تنها ۶۰-۴۲ درصد از مالاریای ایران در استان سیستان و بلوچستان اتفاق می افتد(۳). این بیماری دارای دو پیک فعالیت در بهار و پاییز است(۲). در حال حاضر سم پاشی ابقایی اماکن داخلی و توزیع پشه بندهای طولانی اثر آغشته به حشره کش با عنوان راه کار اصلی مبارزه با ناقلین مالاریا مطرح است(۳و۴). شش گونه آنوفل کولی سیفاسیس، دتالی، فلوویاتیلیس، استفنسی، سوپرپیکتوس، ماکولیپنیس و ساکاروی ناقل قطعی مالاریا در ایران و آنوفل سوپرپیکتوس ناقل ثانویه در ایران است(۲و۵و۶). این آنوفل به عنوان مهم ترین ناقل مالاریا در فلات مرکزی ایران بوده و دامنه انتشار وسیعی در فلات مرکزی تا رشته کوه البرز در شمال و رشته کوه زاگرس در جنوب غرب ایران و با وفور کمتر در سواحل دریای مازندران – خلیج فارس انتشار دارد. این گونه در ارتفاع ۲۰۰۰ متر از سطح دریا صید شده است(۷). دامنه انتشار این گونه به آسیا، اروپا و شمال قاره آفریقا کشیده شده است(۸). مهم ترین ناقل مالاریا در ناحیه پاله آرکتیک، خاورمیانه، شمال آفریقا، هندوستان، افغانستان و پاکستان(۹)، مرکز و جنوب اروپا (۱۰)، روسیه و جمهوری های تازه استقلال یافته(۱۱) است.

رفتار این گونه در برخی از مطالعات اندوفیلیک و محل استراحت آن اماکن انسانی و محل های نگهداری دام گزارش

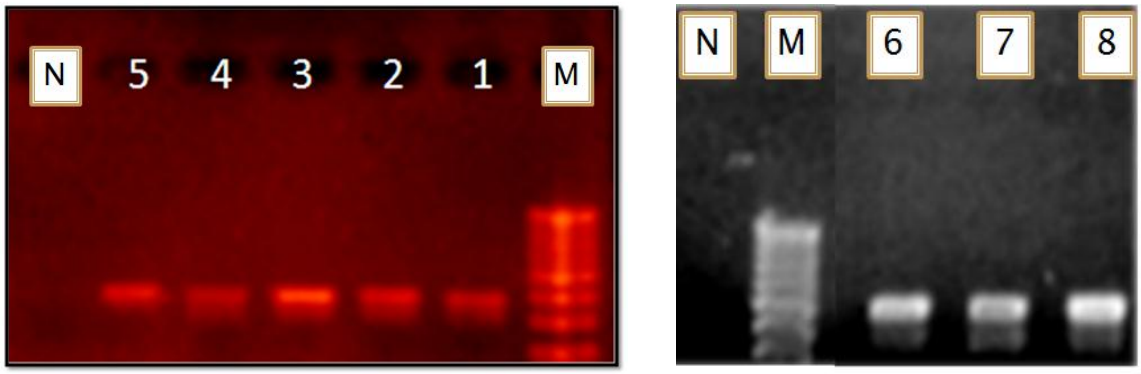
شده است(۱۲). هر دو رفتار اگزوفیلیک و اگزوفاژیک در برخی از مطالعات گزارش شده است(۱۳). میزان آلودگی غده بزاقی پشه ماده به اسپروزوئیت ۴/۵-۰/۶۵ درصد گزارش شده است(۷).
مطالعات مولکولی انجام گرفته در ناحیه مدیترانه با استفاده از قطعه CU1-CU2 میتوکندری مؤید وجود سه ژنوتایپ با تنوع ۱۲/۳ درصد بوده است(۱۴). مطالعات عشاقی و همکاران(۱۵) در قسمت های مختلف ایران به استثنای جنوب غرب کشور نشان داد که ۳ ژنوتایپ با تنوع X-Y-Z در ایران وجود دارد. ژنوتایپ Y-Z در جنوب شرق و ژنوتایپ X در شمال، غرب، جنوب و مرکز کشور پراکنده است. انتشار وسیع و وجود فرم های مختلف مرفولوژیک و ژنوتایپ های Z-X-Y در ایران ممکن است باعث اختلاف در ظرفیت انتقال بیماری مالاریا در نواحی مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد گردد. ممکن است این گونه دارای فرم های بیولوژیک مختلف با SIBLING های مختلف در این دو استان باشد.
آنالیز کروموزوم های پلی تن گونه های مختلف آنوفل سوپرپیکتوس که در نواحی مختلف کشور ایتالیا جمع آوری و آنالیز شد مؤید وجود یک پلی مورفیسم کروموزومال در ناحیه ۱/۳ میانی بازوی کروموزومی بود(۱۶). . این اختلاف می تواند در ظرفیت انتقال بیماری مالاریا در بین اعضای کمپلکس این گونه بسیار تاثیرگذار باشد(۱۷و ۱۸). قطعه ITS2 از ناحیه r DNA جهت شناسایی گونه های آنوفلی که به هم نزدیک هستند بسیار مفید است. تنوع در توالی گونه ای اختصاصی نیز توسط این قطعه قابل شناسایی هستند(۸و۹و۱۲و۱۹ - ۲۱).
هدف از این مطالعه شناسایی گونه های کمپلکس این آنوفل با استفاده از ژن ITS2 در جهت شناسایی کمپلکس آنوفل سوپرپیکتوس در شهرستان یاسوج بوده است تا با استفاده از این مطالعات، برنامه ریزی های دقیق تری در پیشگیری و مبارزه احتمالی با این بیماری داشت.

روش کار

لارو و بالغ پشه های آنوفل سوپرپیکتوس از نقاط مختلف استان های کهگیلویه و بویراحمد جمع آوری گردید. لاروها در محل انسکتاریوم تا مرحله بالغ پرورش داده شدند. علاوه بر آن از روش های صید دستی از اماکن انسانی و محل نگهداری دام ها از مناطق دامنه، دشت و کوهستان به مدت یکسال در سال ۱۳۹۲ صید گردید پشه های صید شده پس از انتقال به محل آزمایشگاه با استفاده از کلید تشخیص(۲۲) بالغین و لارو آنوفل های ایران شناسایی شده و از بین آنها آنوفل های سوپرپیکتوس جدا و به صورت جداگانه پس از خشک شدن نمونه ها داخل تیوب های ml ۱/۵ تا زمان انجام آزمایشات بعدی (استخراج DNA) در فریزر نگهداری شدند. تیوب ها هر کدام جداگانه شماره گذاری و به آنها کد داده شد و کلیه مشخصات ثبت شد.
جهت استخراج DNA از کیت bioneer با شماره K-3032 ساخت کشور امریکا استفاده شد. پرایمر مورد استفاده جهت تکثیر قطعه ITS2 استفاده گردید(۶). پرایمر forward قطعه 58.s ((5-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG- 3) و پرایمر Rewars قطعه 28.s (5- TAT GTC TAA ATT CAG GGG GT- 3) سیکل حرارتی برای مرحله اول ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه با ۹۴ درجه برای ۳۰ ثانیه با ۲۵ سیکل و ۵۳ درجه برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد و برای ۲ دقیقه بوده است. نمونه های PCR با ژل ۱/۵ درصد RUN شد. جهت تعیین توالی نمونه های محصول PCR شرکت تکاپوزیست فرستاده شد و نتایج با استفاده از نرم افزار Clustal X تجزیه و تحلیل شد(۲۳).

یافته ها

این مطالعه اولین مطالعه تنوع ژنتیکی آنوفل سوپرپیکتوس در استان کهگیلویه و بویراحمد است که در آن هشت نمونه از بالغین بررسی شد. نتایج حاصل از محصول PCR بخش ITS2 ژن rDNA به طول bp ۴۴۸ در آنوفل سوپرپیکتوس های شهرستان یاسوج در شکل ۱ نمایش داده شده است. برای تعیین توالی ژن ITS2 و مشخص شدن میزان حقیقی اختلافات ژنتیکی میان جمعیتهای مختلف هر هشت نمونه آنوفل سوپرپیکتوس مورد سکوئنسینگ قرار گرفتند که نتایج آن در Genbank با شماره های دسترسی(Accession Numbers) های KJ409588, KJ409589, KJ409590, KJ409591, KJ409592, KJ409593, KJ409594, KJ409595 به ثبت رسیده اند



شکل ۱- نتایج حاصل از محصول PCR بخش ITS2 ژن rDNA به طولbp ۴۴۸ در آنوفل سوپرپیکتوس های شهرستان یاسوج. ۱,۲,۳,۴,۵,۶,۷,۸ نمونه های آنوفل سوپرپیکتوس .M سایز مارکر bp 100 ،N کنترل منفی، ۱۳۹۲

جهت تعیین درستی توالی ها، تشخیص گونه ها و روابط فیلوژنی نمونه های مورد مطالعه و نمونه های موجود در بانک جهانی ژن، توالی های به دست آمده به کمک نرم افزار Online Blast موجود در Pubmed آزمایش و با سایر توالی های موجود در بانک جهانی ژن در شکل ۲ مقایسه شدند. جهت افزایش اعتماد و قراردادن ریشه(root) در درخت فیلوژنی یک توالی از اسیدهای نوکلئیک ژن ITS2 موجود درGenbank از جنس Anopheles fluviatilis که قرابت زیادی با گونه آنوفل سوپرپیکتوس نداشت به عنوانOutgroup (نماینده خارج از گروه) انتخاب شد. درخت فیلوژنی حاصل در شکل ۳ ارائه شده است. همانطور که درخت شجره شناسی نشان می دهد جمعیت های سوپرپیکتوس ایران در دو دسته کلی قرار می گیرند و در هر دسته گروه های فرعی وجود دارند که هر کدام می توانند نماینده یک گونه باشند. نحوه تقسیم بندی جمعیتها نشان می دهد که به احتمال زیاد جمعیت های جنوب غرب کشور ایران یک گونه و سایر جمعیت های جنوب و جنوب شرق کشور ترکیبی از حداقل دو گونه و حداکثر سه گونه را تشکیل می دهند.

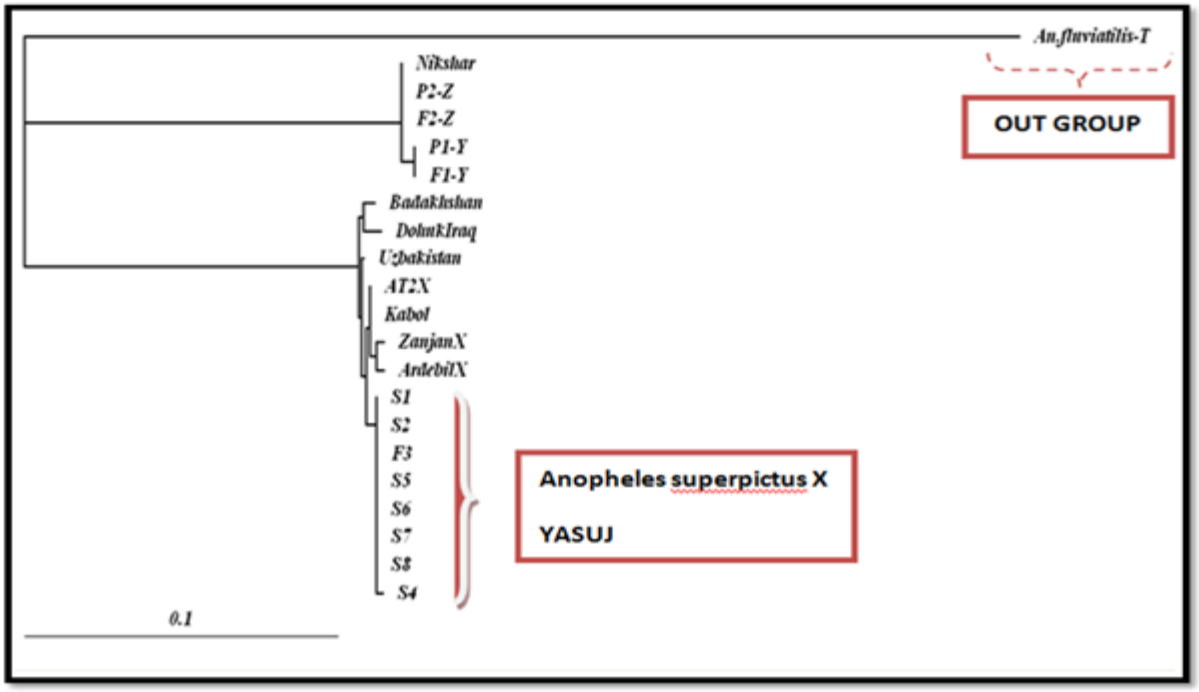
Sequence ID: gb|KJ409591.1| Length: 448 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 448 GenBank Graphics Next Match Previ

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
822 bits(445)	0.0	447/448(99%)	0/448(0%)	Plus/Plus

```
Query  2    TATTGCGCATCGGACGTTTCAACCCGACCGATGCACACATCCTTGAGTGCCTACCTAGTT  61
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    TATTGCGCATCGGACGTTTCAACCCGACCGATGCACACATCCTTGAGTGCCTACCTAGTT  60

Query  62   ATCTATATCCTTTACCAAACTGACTGTCCCTTCCTCGTGATGGGCTGTCGCAACATGGCG  121
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   ATCTATATCCTTTACCAAACTGACTGTCCCTTCCTCGTGATGGGCTGTCGCAACATGGCG  120

Query  122  TGCTCGGACCCGGGACGGGCCCGTGGGCGTTGAAAGTGAGAGTGCTAAGTTAACAGGTGT  181
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  TGCTCGGACCCGGGACGGGCCCGTGGGCGTTGAAAGTGAGAGTGCTAAGTTAACAGGTGT  180

Query  182  GGTACACAAGGCGAGAGATGAACGGGCGCGCGTCAAGTCGCATCAGGTTCGACCTCCAGT  241
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  GGTACACAAGGCGAGAGATGAACGGGCGCGCGTCAAGTCGCATCAGGTTCGACCTCCAGT  240

Query  242  ATCAACCAGGGATGAAACCCCCGCAGCCTAACAGATTAACACCAGGCGCTAGCAAAGGGG  301
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  ATCAACCAGGGATGAAACCCCCGCAGCCTAACAGATTAACACCAGGCGCTAGCAAAGGGG  300

Query  302  TCCCAGGTTGGCTCGGGTCGTGTAACACTTGCGGCCCAACGCGTCCGTCACCATCTACTC  361
            |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  TCCCAGGTTGGCTCGGGTCATGTAACACTTGCGGCCCAACGCGTCCGTCACCATCTACTC  360

Query  362  GCCCTCGTTCGGGTAGCCACTCACAGAGTGAGATACTAGAACTTCGAGTAGGCCTCAAGT  421
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  GCCCTCGTTCGGGTAGCCACTCACAGAGTGAGATACTAGAACTTCGAGTAGGCCTCAAGT  420

Query  422  GATGTGTGACGACCCCCTGAATTTAAGC  449
            ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  GATGTGTGACGACCCCCTGAATTTAAGC  448
```

شکل ۲- نتیجه Blast نمونه های مورد مطالعه و نمونه های موجود در بانک جهانی ژن



شکل ۳- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز ۴۴۸ bp از بخش ITS2 ژن rDNA، ۸ نمونه از An.superpictus X شهرستان یاسوج در این درخت نشان داده شده است. توالی بقیه گونه های کمپلکس An.superpictus نیز An.fluviatilis به عنوان گونه های خارج از گروه می باشد. مقیاس اختلاف ژنتیکی بین نمونه ها در زیر درخت نشان داده شده است.

بحث

با توجه به پراکندگی بسیار وسیع آنوفل سوپرپیکتوس در ایران و نیز اختلافات مورفولوژیک، کرموزومی، رفتاری و آلودگی به انگل مالاریا در این گونه و هم چنین به دلیل افزایش مسافرت ها (ورود و خروج) به مناطق اندمیک و خطر امکان بازگشت مالاریا به مناطق پاک شده تحت اشغال این گونه، تشخیص دقیق ساختار جمعیت های مختلف آنوفل سوپرپیکتوس جهت شناسایی و تعیین هویت آنها برای مطالعات و اقدامات پیشگیری کننده مالاریا در ایران اقدامی لازم به نظر می رسد. در این پژوهش ژنوتایپ های X در استان کهگیلویه و بویراحمد گزارش شد. عشاقی و همکاران در سال ۲۰۰۷ - ۲۰۰۸ ژنوتایپ Y-Z در اردبیل، شمال غرب لرستان، زنجان و فارس گزارش نموده اند. بر اساس مطالعه دکتر عشاقی و همکاران دو خوشه Z-Y-X کاملا از هم جدا می باشند. اختلاف ژنتیکی بین آن ها ۲۵٪ می باشد و این اختلاف فراتر از اختلاف درون گونه ای است(۱۵و۲۴). در مطالعات مشابه اختلافات درون گونه ای کمتر از ۰/۱ درصد برای آنوفل گامبیه و ۲٪برای آنوفل ساکاروی گزارش شده است(۲۵). این اختلاف برای آنوفل کولیسیفاسیس گونهA,B چهار تا پنج درصد و بین آنوفل گامبیه تا شش درصد بوده است(۱۰). مطالعات محکم تر موافق با مطالعه ما نشان می دهد که قطعه ITS2 قادر به تفکیک گونه های کمپلکس X از یک طرف و Z-Y از طرف دیگر بوده است. مطالعات سیتوژنتیکی انجام شده بر روی نمونه های مختلف آنوفل سوپرپیکتوس در جنوب ایتالیا نشان داده که پلی مورفیسم کروموزومی در گونه های آنوفل اکثرا ارتباط مستقیمی با قدرت انتقال بیماری مالاریا دارند(۲۸-۲۶).

بنابراین انجام مطالعات ژنتیکی و مشخص نمودن ساختار ژنتیکی جمعیت ها در کنار سایر مطالعات اپیدمیولوژیک می تواند درهدفمند نمودن مبارزه با ناقلین مالاریا موثر واقع شود. در این مطالعه اختلافات ژنتیکی زیادی بین جمعیت های مختلف سوپرپیکتوس مورد مطالعه مشاهده نشد. نبود اختلافات بیشتر وابسته و مربوط به منطقه جغرافیایی صید شده است چون روش های صید و مکان و زمان صید در دو منطقه یکسان بود این بررسی تاثیر اقلیم ها و آب و هواهای مختلف بر تنوع ژنتیکی گونه سوپرپیکتوس در مناطق مختلف جغرافیایی را نشان نمی دهد. نتایج حاصله نشان دادند که حداقل یک گونه ژنتیکی در بین جمعیت های مختلف این گونه وجود دارد. این نتایج نشان دادند که فرمهای مناطق جنوب شرقی کشور کاملا متمایزاز گونه یا فرم موجود در مناطق جنوب شرق کشور هستند. نکته قابل توجه این است که در مطالعه ی عشاقی و همکاران دز سال۲۰۰۷و ۲۰۰۸ در منطقه بلوچستان تنوع ژنتیکی مشاهده شده بین نمونه ها خیلی زیاد بود(۱۵و۲۴). یکی از دلایل تنوع بسیار بالا در منطقه بلوچستان مربوط به موقعیت منحصر به فرد منطقه بلوچستان می باشد که در محل تلاقی سه منطقه اورینتال، پاله آرکتیک، و آفروتروپیکا قرار گرفته است و بدین ترتیب ترکیبی از گونه ها یا فرمهای بیولوژیکی سازگار با این سه منطقه را به طور همزمان می تواند در برداشته باشد. در حالی که استانهای کهگیلویه و بویراحمد و خوزستان در منطقه پاله آرکتیک واقع است و فرم های آنوفل سوپرپیکتوس این منطقه با نقاط مرکزی، شمال غربی و شرقی کشور مشابهت دارد. البته نقش هر کدام از این اعضا در انتقال بیماری مالاریا در استان گهکیلویه و بویر احمد و خوزستان و نیز سایر نقاط کشور باید در مطالعات آینده مورد بررسی قرار گیرد.

عشاقی و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان تنوع ژنتکی در ژن COI جمعیت های بلوچستان۵-۲٪ گزارش نمودند(۲۱). این مقدار بیشتر از میزان تغییرات گزارش شده درون جمعیت یک گونه (Intra-population variation) برای مثال در درون گونه آنوفل گامبیه کمتر از ۰/۱ درصد(۳۱-۲۹) درون گونه آنوفل ساکاروی این مقدار ۲٪ گزارش شده است(۲۵). این میزان در An.culicifacies complex ٪۴-۵ و در در کمپلکس آنوفل گامبیه ۰ تا ۶ ٪ محاسبه شده است(۱۰و۲۹و۳۱). بنابراین به احتمال زیاد گونه آنوفل سوپرپیکتوس با بیش از ۱۲ ٪ اختلاف ژنتیکی شامل بیش از یک گونه است و از گونه های کمپلکس محسوب می شود. این اولین گزارش از وجود حداقل یک گونه کمپلکس کمپلکس بودن این گونه در دنیا می باشد.

نتیجه گیری

بر اساس این مطالعه به نظر می رسد که گونه های فعال و انتشار یافته در نواحی شمالی ، مرکزی و غرب و جنوب غربی کشور که شامل گونه های X هستند نقش مهم تری در انتقال مالاریا در گذشته داشته اند. بررسی و تعیین قطعی تعداد گونه های سیبلینگ آنوفل سوپرپیکتوس در تمام نقاط انتشار آن در

ایران و نقش هر کدام در انتقال مالاریا به مطالعات وسیع وهمه جانبه نیازمند بوده و باید با مطالعات اپیدمیولوژیک مالاریا همراه گردد. علاوه بر این لازم است نتایج بدست آمده در این تحقیق باسایر مطالعات ژنتیکی از جمله مطالعه بر روی سایر بخش های ژنوم میتوکندری و هسته و نیز مطالعات
سیتولوژیک بخصوص کرموزوم های پلی تن مقایسه و مورد تایید قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می دانند از همکاری های صمیمانه اقای مهندس پارسایی کارشناس گروه پیشگیری و مبارزه با بیماریهای استان کهگیلویه و بویراحمد جهت هماهنگی های لازم و کلیه پرسنل بهداشتی مراکز بهداشتی درمانی روستایی
اعم از کاردانان مبارزه با بیماریها و بهورزان زحمتکش استان کهگیلویه و بویراحمد به خاطر همکاری در اجرای این مطالعه تشکر و قدردانی نمایند.

این طرح تحقیقاتی از حمایت های مالی معاونت پژوهشی علوم پزشکی تهران۹۷-۰۲-۲۷-۲۲۴۴۴ برخوردار بوده است.

REFERENCES

1. Soleimani-Ahmadi M, Vatandoost H, Shaeghi M, Raeisi A, Abedi F, Eshraghian MR. Vector ecology and susceptibility in a malaria endemic focus in southern Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2012 ; 18(10): 1034-1041.
2. Vatandoost H, Emami SN, Oshaghi MA, Abai MR, Raeisi A,Piazzak N, et al. Ecology of malaria vector *Anopheles culicifacies* in a malarious area of Sistan va Baluchestan province, south-east Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2011; 17(5): 439-445.
3. Nejati J, Ansari Moghadam AR, Keyhani A, Tabatabai SM. Effects of immigration on malaria incidence and its foci classification. Hormozgan Med J 2012; 16(4): 281-291.
4. Enayati A, Hemingway J, Malaria management: Past, present, and future. Annu Rev Entomol 2010; 55: 569-591.
5. Vatandoost H, Ashraf H, Salari lak SH, Entezarmahdi R, Abai MR & Nazeri M (2003) Factors involved in the re-emergence of malaria in borderline of Iran Armenia Azerbaijan and Turkey. Southeast Asian .J Trop Med Public Health, 2003, 34, 6-14.
6. Vatandoost H, Abdoljabari-Boonab R, Abaei MR,Oshaghi MA, Rassi Y (2005). Entomological survey in Kalibar A resurgent malaria focus in East-Azerbaijan Iran. Pakistan J Biol Sci, 2005, 8, 1466-1471.
7. Abraova AB, Chudinov OS, Gordeev MI, Zvantsov AB & Ezhovmnrapd analysis of the populations of the malaria mosquitoes *Anopheles superpictus* and *An pulcherrimus* in the malaria foci of the central Asia. MedParazitol (Mosk), 2005, 3, 5-8 (in Russian).
8. 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 Nov; 53(5):478-481.
9. Beebe NW, Ellis JT, Cooper RD, Saul A. DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. Insect Mol Biol. 1999 Aug; 8(3):381-390.
10. Besansky N.J., powell,J. R., Caccone, A. and Hamm D.M. Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* suggests genetic introgression between principal malaria vectors. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA). 1994; 91:6885-6888.
11. Collins FH & Paskewitz SM – A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic Anopheles species. Insect Mol Biol, 1996, 5, 1-9.

12. Cornel AJ, Porter CH, Collins FH. Polymerase chain reaction species diagnostic assay
13. for Anopheles quadrimaculatus cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. J Med Entomol. 1996 Jan; 33(1):109-116.
14. Di Luca M, Boccolini D, Marinucci M & Romi R Intrapopulation polymorphism in *Anopheles messeae* (An.maculipennis complex) inferred by molecular analysis. J Med Entomol, 2004, 41, 582-589.
15. Odolini S, Gautret P, Parola P. Epidemiology of imported malaria in the mediterranean region. Mediterr J Hematol Infect Dis 2012; 4(1): doi: 10.4084/MJHID.2012.031.
16. Oshaghi MA, Shemshad Kh, Yaghobi-Ershadi MR, Pedram M, Vatandoost H, Abaie MR, Akbarzadeh K, Mohtarami F (2007). Genetic structure of the malaria vector *Anopheles superpictus* in Iran using mitochondrial cytochrome oxidase (COI and COII) and morphologic markers: a new species complex? Acta Trop.(2007) Mar;101(3):241-8. Epub 2007 Feb 20.
17. Knight K & Stone A – A Catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). Collage Park, MD. Entomol Soc Am, 1977, 611pp.
18. Kumar A & Rai KS – Chromosomal localization and copy number of 18S- 28S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse mosquitoes (Diptera: Culicidae). Hered, 1990, 113.۲۸۹-۲۷۷,
19. Kuhn KG, Campbell-Lendrum DH & Davies CR – A continental risk map for malaria mosquito (Diptera: Culicidae(vectors in Europe. J Med Entomol, 2002, 39, 621-630
20. Fritz GN, Conn J, Cockburn A & Seawright JA – Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). Mol Biol Evol, 1994, 11, 406-416.
21. Porter CH & Collins FH – Species diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). Am J Trop Med Hyg, 1991, 45, 271-279.
22. Walton C, Handley JM, Kuvangkadilok C, Collins FH, Harbach RE et al. – Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand using allele-specific polymerase chain reaction. Med Vet Entomol, 1999, 13, 24-32
23. Shahgudian, E.R. Biological and Bionomic features of malaria vectors in Iran, their role and importance. Sch Publ Hlth 1962; 9: 1-8.
24. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F& Higgins DG – The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, 1997, 24, 4876-4882
25. Oshaghi MA, Yaghobi-Ershadi MR, Shemshad K, Pedram M, Amani H (2008).The *Anopheles superpictus* complex: introduction of a new malaria vector complex in Iran.Bull Soc Pathol Exot. (2008) Dec;101(5):429-34.
26. Sedaghat, M.M., Linton,Y.-M., Nicolescu, G., Smith, L , Koliopoulos, G., Zounos,A.K., Oshaghi,M.A., Vatandoust, H. &Harbach, R.E. Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East. Systematic Entomology. (2003); 28, 1-16.
27. Sabatini A, Coluzzi M, Boccolini D. Field studies on inversion polymorphism in *Anopheles superpictus* from southern Italy. Parassitologia (1989); 31: 69-87.
28. Subbarao KS. Anopheline species complexes in south-east Asia. World Health Organization Documents: (1997) 81pp.

29. Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-yovo J, Favia G, Petrarca V, et al. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. Insect Mol Biol (2001); 10: 9-18
30. Oshaghi, M.A. The use of mitochondrial DNA in the molecular systematics of malaria vectors. Ph.D. Thesis University of Liverpool, Liverpool School of Tropical Medicine. (1998), 355pp.
31. Beard CB, Hamm DM, Collins FH. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. Insect Mol Biol 1993; 2: 103-24.
32. 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: 520-9.