

تشخیص گونه‌های پلاسمودیوم انسانی با روش PCR-RFLP

علی ابراهیمی^۱، عبدالحسین دلیمی‌اصل^{۲*}، بهرام کاظمی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۱۰

دریافت مقاله: ۸۵/۱۱/۱۸

چکیده

هدف: مalaria یکی از مهمترین بیماریهای مناطق گرمسیری در جهان بشمار می‌آید که علاوه بر شیوع فراوان باعث مرگ و میر انسانها می‌گردد. تشخیص گونه‌های عامل این بیماری، مبتنی بر روش‌های بالینی، پارازیتولوژیکی، بیوشیمیایی، سرولوژیکی و مولکولی است. هدف از مطالعه حاضر، مقایسه روش‌های تهیه گسترش خونی و مولکولی برای تشخیص گونه‌های پلاسمودیوم است.

مواد و روش‌ها: از ۴۶ نمونه خون مثبت مalaria، که با گسترش‌های نازک و ضخیم مشخص شده، DNA انگل، استخراج و قطعه‌ای از ژن ۱۸S RNA ریبوزومی با استفاده از آغازگرهای طراحی شده تکثیر گردید و با کمک از آنزیم‌های Hinf I، Hae III و Tsp45 I قطعه برش داده شد.

نتایج: طبق نتایج بدست آمده، از ۴۶ نمونه خون مثبت، با بررسی گسترش‌های نازک، ۳۵ مورد پلاسمودیوم ویواکس و ۱۱ مورد پلاسمودیوم فالسی‌باروم تشخیص داده شد؛ در حالی که با روش مولکولی، ۲ مورد از ۱۱ مورد پلاسمودیوم فالسی‌باروم، به عنوان پلاسمودیوم ویواکس و ۳ مورد از ۳۵ مورد پلاسمودیوم ویواکس به عنوان پلاسمودیوم فالسی‌باروم، مشخص شد.

نتیجه گیری: روش PCR-RFLP در مقایسه با گسترش خونی، روشنی بسیار مناسب تر و حساس‌تر برای تفکیک گونه‌های پلاسمودیوم است.

کلیدواژگان: تشخیص مalaria، پلاسمودیوم ویواکس، پلاسمودیوم فالسی‌باروم، PCR-RFLP

۱- مقدمه

مطالعه Malaria علاوه بر روش تهیه گسترش خونی، از آزمایش‌های سرولوژی نیز استفاده می‌شود. آزمایش‌های رسوی، ملانوفلوكولاسیون (Haemagglutination)، هماگلوتیناسیون (Melano-flocculation) غیر مستقیم، روش‌های ثبوت مکمل، ایمنوفلورسانس (Indirect fluorescent Antibody) IFA، (Immunofluorescent) و الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) از

Malaria دارای گسترش جهانی است. امروزه بیش از دویست میلیون نفر در هر سال به این بیماری آلوده می‌شوند و دو میلیون نفر از این تعداد، در اثر عوارض ناشی از این بیماری می‌میرند. لذا تشخیص‌های سریع و درمان زود هنگام بیماری، سبب کاهش مرگ و میر ناشی از آن می‌گردد [۱]. در تشخیص این بیماری از روش‌های متعددی استفاده می‌شود در

۲- مواد و روش کار

- ۱- از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های شهرستانهای چابهار و زاهدان نمونه خون گرفته شد و در مجموع، ۶۴ نمونه خون مثبت مalaria ب با روش گسترش ضخیم تشخیص داده شد.
- ۲- گونه انگل با روش گسترش نازک خونی، رنگ آمیزی با رنگ گیمسا (Geimsa) و بررسی با میکروسکوپ نوری در آزمایشگاه صورت گرفت.
- ۳- استخراج DNA پلاسمودیوم‌ها: DNA انگل با کیت Cinnagen DNA-PLUS طبق دستورالعمل سازنده کیت استخراج شد.
- ۴- انجام Nested-PCR: برای انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرازی از دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf) استفاده شد.

بدین ترتیب که با استفاده از آغازگر (Primer) اختصاصی، قسمتی از ژن کد کننده rRNA ۱۸S تکثیر گردید. توالي این ژن از بانک ژن به دست آمد و به وسیله شرکت ژلت است الیکوز ستز و به صورت لیوفلیزه ارسال شد. ترکیب آغازگرهای به صورت زیر می‌باشد:

۱- ۵'-AAC CTG GTT GAA CTT GCC AGT AGT-۳'
 ۲- ۵'-CCA AGC TAC TCC TAT TAA TCG TAA-۳'
 ۳- ۵'-TAT ATG TAG AAA CTG CGA ACG GTC-۳'
 ۴- ۵'-CAA CTA CGA GCG TTT TAA CTG CAA-۳'

پس از تهیه مخلوط کلی برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر به این شکل تنظیم شد که ابتدا نمونه در ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه قرار داده شد، سپس مراحل زیر در چرخه تکرار گردید: ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و اسرشتگی (Denaturation)، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه جفت‌شدگی (Annealing)، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه طویل شدن (Extension) و در مرحله آخر طویل شدن در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

جمله این شیوه‌ها است.

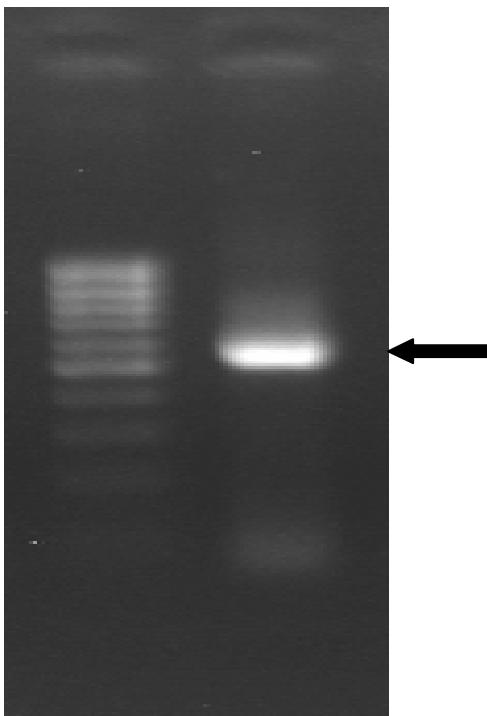
برخی از محققین از روش PCR برای جنبه‌های مختلف از جمله تشخیص مalaria استفاده نموده‌اند. به طورکلی کاربرد PCR در تشخیص اولیه بیماری مalaria، افتراق گونه‌های انگل مalaria، (به خصوص در مواقعی که تعداد کمی از انگل در خون موجود است و تشخیص آنها با روش میکروسکوپی مشکل است)، پی‌گیری و ردیابی درمان دارویی و پاسخ بیمار به داروهای ضد Malaria، مطالعات تنوع گونه و آنالیز گونه‌ها، زیرگونه‌ها یا سوش‌ها، جهش‌ها و آزمایش‌های ژنتیکی مانند مقاومت دارویی و مطالعه‌های ژن‌های انگل که در مقاومت دارویی دخیل هستند، مشخص نمودن ژنوتاپ (genotype) انگل، بررسی تنوع انگل و بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بسیار مفید است [۶-۲]. علاوه بر این تشخیص مقادیر کم انگل‌های Malaria در خون یا سرم و به ویژه در نمونه‌های متعدد، تشخیص بیماری در مسافران بازگشته از مناطق بومی به صورت گذشته نگر، ردیابی گونه‌های انگل Malaria در جمعیت کل، بررسی انتشار جغرافیایی آن‌ها، تأیید پاک شدن انگل پس از درمان، تشخیص و افتراق عفونت‌های مجدد ناشی از نارسایی درمان، غربال‌گری اهداف‌گان خون، تعیین و شناسایی حاملان بدون علامت در مناطق بومی در بررسی‌های اپیدمیولوژیک، تشخیص مalaria مادرزادی، تشخیص و شناسایی عفونت‌های مختلط، که از نظر میکروسکوپی، به خصوص وقتی که یکی از گونه‌های پلاسمودیوم (Plasmodium) مغلوب و کمتر از حد لازم برای تشخیص باشد در همه این موارد یا این که بیش از دو گونه انگل در عفونت موجود باشد کارایی روش‌های مولکولی بسیار زیاد است [۸,۷,۵].

اهداف این پژوهش عبارت بوده است از:

- ۱- تشخیص گونه‌های مختلف پلاسمودیوم از بیماران آلوده و مبتلا به Malaria با روش PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)
- ۲- مقایسه روش فوق با روش تشخیص بیماری با گسترش خونی.

نتایج حاصل از استخراج DNA

شکل شماره ۱ باند قطعه DNA مربوط به محصول PCR ژن ۱۸S rRNA را نشان می‌دهد. این قطعه حدود ۵۸۰ جفت باز است.



شکل ۱ باند مربوط به تکثیر قطعه ژن ۱۸S rRNA پلاسمودیوم که این قطعه حدود ۵۸۰ جفت باز است (الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد) از چپ به راست: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، قطعه ژن ۱۸S rRNA پلاسمودیوم تکثیر یافته.

۱-۳- نتایج برش آنزیمی

آنژیم Hinf I، پلاسمودیوم فالسیپاروم و پلاسمودیوم مالاریه را از پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم اوواله جدا می‌کند. بعد از الکتروفورز، پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم اوواله به سه قطعه و پلاسمودیوم فالسیپاروم و پلاسمودیوم مالاریه به دو قطعه دیده می‌شوند. بنابراین سه قطعه ژن به اندازه‌های ۱۸۷، ۱۹۵ و ۲۵۵ جفت باز از مرحله هضم آنزیمی به دست می‌آید. از آنجا که وزن دو قطعه اول بسیار به هم نزدیک است، لذا روی ژل آگارز ۲ درصد فقط دو باند دیده می‌شد. این آنزیم بر روی توالی ژن در دو پلاسمودیوم دیگر یعنی پلاسمودیوم فالسیپاروم و

۵- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد.

۶- انجام RFLP بر روی محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های برش دهنده: برای انجام RFLP از آنزیم‌های Hinf I Tsp45 I Hae III Hinf I پلاسمودیوم فالسیپاروم (*Plasmodium falciparum*) و پلاسمودیوم مالاریه (*Plasmodium malariae*) را از پلاسمودیوم ویواکس (*Plasmodium vivax*) و پلاسمودیوم اوواله (*Plasmodium ovale*) جدا می‌کند. برای جداسازی پلاسمودیوم فالسیپاروم از پلاسمودیوم مالاریه از آنزیم Hae III و برای تفکیک پلاسمودیوم ویواکس از پلاسمودیوم اوواله از آنزیم Tsp45 I استفاده شد.

۳- نتایج

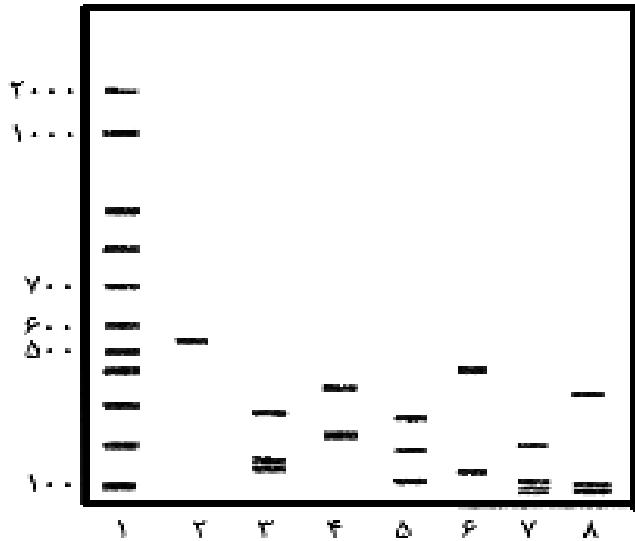
جدول شماره ۱ نتایج بررسی نمونه‌ها با دو روش گسترش خونی و مولکولی را نشان می‌دهد. بین بررسی مولکولی و روش گسترش خونی تفاوت‌هایی در تشخیص گونه پلاسمودیوم مشاهده شد. این تفاوت‌ها بدين صورت بود که از ۳۵ مورد تشخیص داده شده با گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده با گیمسا، که پلاسمودیوم ویواکس بودند، ۳ مورد از آنها پلاسمودیوم فالسیپاروم و از ۱۱ مورد پلاسمودیوم فالسیپاروم، ۲ نمونه پلاسمودیوم ویواکس بودند. بدين ترتیب ۳۴ مورد از نمونه‌ها، پلاسمودیوم ویواکس و ۱۲ مورد پلاسمودیوم فالسیپاروم حاصل تشخیص مولکولی نمونه‌ها هستند. برای تأیید این تشخیص، سه بار این آزمایش‌ها تکرار شد تا از روند کار اطمینان حاصل شود.

جدول ۱ نتایج بررسی نمونه‌ها با دو روش گسترش خونی و مولکولی

| روش مولکولی | روش گسترش خونی | | نوع آلدگی | |
|-------------|----------------|-------|-----------|-----------------------|
| | درصد | تعداد | درصد | تعداد |
| ۷۳/۹ | ۳۴ | ۷۶۰۹ | ۳۵ | پلاسمودیوم ویواکس |
| ۲۶/۱ | ۱۲ | ۲۳/۹۱ | ۱۱ | پلاسمودیوم فالسیپاروم |

ویواکس را به سه قطعه ۱۴۷، ۲۰۸ و ۲۶۲ جفت بازی ولی پلاسمودیوم اوواله را به دو قطعه تقسیم می‌کند (شکل ۳).

پلاسمودیوم مالاریه فقط یک محل برش دارد. از این رو دو قطعه ۲۵۸ و ۳۸۲ جفت باز در مرحله آشکارسازی ژل ۲ درصد دیده می‌شود (شکل ۳).

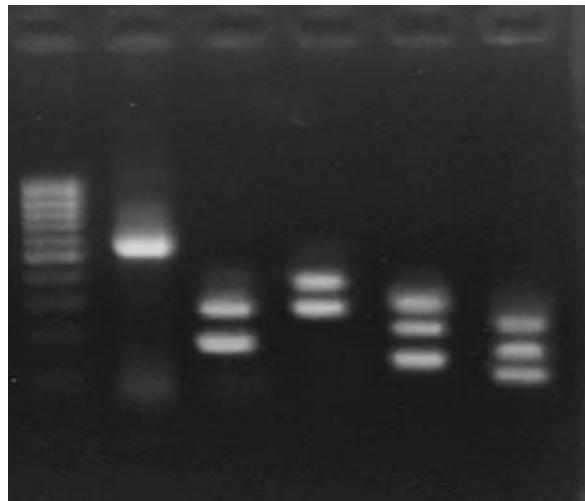


شکل ۳ تصویر شماتیک الگو نمونه گونه‌های پلاسمودیوم انسانی در تکیک PCR-RFLP

ستون یک: نشانگر ۱۰۰ جفت باز؛ ستون دو: محصول PCR؛ ستون سه: الگو پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم اوواله بعد از آنزیم Hinf I؛ ستون چهار: الگو پلاسمودیوم فالسی‌پاروم و پلاسمودیوم مالاریه بعد از آنزیم Hinf I؛ ستون پنجم: الگو پلاسمودیوم ویواکس بعد از آنزیم Tsp45I؛ ستون شش: الگو پلاسمودیوم اوواله بعد از آنزیم Tsp45I؛ ستون هفتم: الگو پلاسمودیوم فالسی‌پاروم بعد از آنزیم HaeIII؛ ستون هشتم: الگو پلاسمودیوم مالاریه بعد از آنزیم HaeIII.

۴- بحث

درباره آزمون‌های تشخیص پلاسمودیوم‌های عامل بیماری مالاریا در انسان، هنوز هم استفاده از لام‌های نازک و ضخیم با رنگ‌آمیزی گیمسا به عنوان استاندارد طلایی مطرح است. استفاده از این لام‌ها از نظر هزینه ارزان و مقرن به صرفه است. اما روشی بسیار وقت‌گیر است و به کارکنان با تجربه نیاز دارد. حساسیت تشخیصی گسترش‌های ضخیم بیشتر از گسترش نازک است. اما گسترش‌های نازک به منظور افترار گونه‌های چهارگانه پلاسمودیوم و تعیین بار انگلی بکار می‌روند. تنها مسئله‌ای که باقی می‌ماند، پایین بودن حساسیت این روش در موارد پایین بودن بار انگلی، یعنی ۱۰ انگل در هر میلی‌متر مکعب خون است [۹]. سایر روش‌های جدیدی که



شکل ۲ الگوی هضم آنزیمی قطعه ژن ۱۸S rRNA پلاسمودیوم

توضیح شکل از چه:

ستون اول: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون دو: قطعه ژن ۱۸S rRNA پلاسمودیوم؛ ستون سه: پلاسمودیوم ویواکس بعد از آنزیم Hinf I؛ ستون چهار: پلاسمودیوم فالسی‌پاروم یا پلاسمودیوم مالاریه پس از اثر آنزیم Hinf I؛ ستون پنجم: پلاسمودیوم ویواکس پس از آنزیم Tsp45I؛ ستون شش: پلاسمودیوم فالسی‌پاروم پس از اثر آنزیم Hae III.

برای تفکیک پلاسمودیوم فالسی‌پاروم از پلاسمودیوم مالاریه، از آنزیم Hae III استفاده شد. آنزیم Hae III توالي ژنی پلاسمودیوم فالسی‌پاروم را در جایگاه‌های ۲۱۶، ۳۴۱ و ۴۹۲ جفت بازی برش می‌دهد. این امر منجر به تشکیل چهار قطعه ژن روی ژل آکارز ۲ درصد می‌شود. قطعات ایجاد شده به ترتیب ۱۲۵، ۱۴۸، ۱۵۱ و ۲۱۶ جفت باز دارند، اما روی این ژل فقط سه قطعه دیده می‌شود (شکل ۲). آنزیم Hae III پلاسمودیوم مالاریه را در محل بازهای ۳۴۵ و ۴۹۶ برش می‌دهد. از فرایند این برش، سه قطعه ۱۴۷، ۱۵۱ و ۳۴۵ جفت باز به دست می‌آید. ولی روی این ژل دو قطعه دیده می‌شود. برای جداسازی پلاسمودیوم ویواکس از پلاسمودیوم اوواله، از آنزیم Tsp45 استفاده شد. این آنزیم، پلاسمودیوم

سرولوژیکی است. در مطالعه‌ای که به وسیله ادريسیان و همکاران در سال ۱۹۷۹ میلادی در جنوب ایران انجام شد، مقایسه‌ای بین دو روش IFA و الایزا از نظر جستجوی پادتن مalariaیایی به عمل آمده است. براساس این نتایج، موارد مثبت در روش IFA در بزرگسالان بیش از روش الایزا بوده است [۱۴]. در مجموع استفاده از روش الایزا در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی در مناطقی که بیش از یک نوع انگل malarیا وجود دارد، با توجه به سهولت کار و اقتصادی بودن از نظر هزینه می‌تواند مفید باشد. در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی malarیا به منظور معین شدن فراوانی موارد مثبت بیماری در ساکنان یک منطقه، آزمایش‌های سرولوژیک می‌توانند در ارزشیابی برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی malarیا، کمک به تأیید تشخیص موارد حاد بیماری، تعیین نوع انگل ایجاد کننده بیماری و ردیابی اهداف‌گان خون (به عنوان ناقلان بیماری) مفید باشند [۱۵].

استفاده از فناوری تکثیر اسیدهای نوکلئیک از دستاوردهای جدید در زمینه تشخیص انگل‌های malarیا است. آنچه که این روش را از سایر روش‌ها تمایز می‌نماید و بیشتر پژوهشگران در استفاده از آن اتفاق نظر دارند، حساسیت و ویژگی فوق العاده زیاد و قابلیت بالای افتراق گونه‌ها نسبت به شیوه گسترش ضخیم است. تاکنون پژوهشگران متعددی از این روش استفاده نموده‌اند که به عنوان مثال می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تکثیر ژن ۱۸S با Nested-PCR به وسیله استنونو و همکاران [۱۶]. استفاده از روش Nested-PCR (به وسیله ذاکری و همکاران در کشور ایران برای rRNA تفکیک گونه‌های پلاسمودیوم از یکدیگر [۱۷]. تکثیر ژن CSP (Circum Sporozoite) به عنوان یک شیوه قابل اعتماد در تشخیص و افتراق گونه‌ها [۷] و انجام تکنیک PCR چندگانه (Multiplex PCR) به عنوان یک شیوه قابل اعتماد در تشخیص و افتراق گونه‌ها [۱۸]. PCR-RFLP یکی از حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش‌های علمی موجود می‌باشد که در این پژوهش از آن استفاده شد.

سال‌های اخیر در تشخیص انگل‌های malarیا بکار برده شده‌اند، همگی بر حسب کاربری حساسیت و ویژگی متفاوت دارند. روش Quantitative Buffy Coat (QBC)، یکی از روش‌های نسبتاً جدید، سریع، تقریباً حساس و اختصاصی برای تشخیص انگل‌های malarیا است. در این شیوه نمونه خون آلوده در لوله‌های موئینه حاوی هپارین (Heparin) و رنگ آکردن نارنجی ریخته می‌شود و بعد از سانتریفوژ، انگل‌های رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ ایمنوفلورسانس، قابل تشخیص هستند. این روش برای تعیین گونه‌های malarیا، از کارایی مناسبی برخوردار نیست [۱۰]. در مطالعه دیگری، حساسیت این روش ۵۶ درصد و ویژگی آن ۹۵ درصد تعیین شده است. با این وجود، به نظر می‌رسد این روش نتواند جایگزین مناسبی برای گسترش ضخیم و نازک باشد؛ از طرف دیگر یکی دیگر از محلودیت‌های این روش، نبود میکروسکوپ ایمنوفلورسانس در برخی از آزمایشگاه‌ها است [۲].

استفاده از نوارهای تشخیص آنتی ژن‌های پلاسمودیوم فالسی‌پاروم، از یافته‌های دیگر و جدید در عرصه تشخیص malarیا می‌باشد. از این گروه می‌توان به آزمایش‌های انگلی F (Immunochromatographic test) ICT (Falciparum) مalarیا اشاره نمود. در این دو آزمایش پادتن‌های پوشش شده متصل روی فاز جامد یا همان نوار در صورت مواجه شدن با آنتی ژن پروتئین II غنی از هیستیدین (Histidin)، که در گلبول‌های آلوده پلاسمودیوم فالسی‌پاروم یافت می‌شود، با ایجاد یک واکنش رنگی، قابل تشخیص خواهد بود [۱۳، ۱۲]. به طور کلی این روش‌ها دارای کاربری آسان، حمل و نقل راحت و سریع (ده دقیقه) است. از مشکلات این آزمایش‌ها گزارش موارد بالای مثبت کاذب در تشخیص دادن و پایین بودن حساسیت و ویژگی نسبت به روش استفاده از گسترش خونی ضخیم است. در این شیوه حداقل تعداد ۴۰ انگل در میلی‌متر مکعب خون برای تشخیص مورد نیاز است [۱۳، ۱۲]. از جمله آزمون‌های دیگر تشخیص malarیا روش‌های

درستی کار، DNA افراد ساکن در مناطق پاک و غیر آلوه به مalaria بررسی شد و هیچ گونه واکنش متقاطعی در آنها مشاهده نشد.

از مزایای شاخص در شیوه PCR-RFLP، زمان است. زیرا به راحتی بعد از استخراج DNA می‌توان PCR-RFLP را در طی یک روز انجام داد.

در این تحقیق فقط دو گونه از چهار گونه پلاسمودیوم در خون افراد آلوه به malaria، مشاهده شد که پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسی پاروم بودند و پلاسمودیوم مalaria در این نمونه‌ها دیده نشد. سه مورد از پلاسمودیوم ویواکس و دو مورد پلاسمودیوم فالسی پاروم که در تشخیص میکروسکوپی اشتباه تشخیص داده شده بودند با روش مولکولی تأیید شدند.

در این میان از طریق تشخیص لامهای نازک رنگ آمیزی شده با گیسا ۷۶۰۹ درصد آلوهگی مربوط به پلاسمودیوم ویواکس و ۲۳/۹۱ درصد آلوهگی مربوط به پلاسمودیوم فالسی پاروم بودند. بعد از انجام ۷۳/۹ PCR-RFLP ۷۳/۹ درصد آلوهگی مربوط به پلاسمودیوم ویواکس و ۲۶/۱ درصد آلوهگی مربوط به پلاسمودیوم فالسی پاروم شناسایی شدند.

با استفاده از این روش و مقایسه اختلاف محل قرارگیری باندهای ایجاد شده بر روی ژل الکتروفورز حاصل از برش آنزیمی آنزیم‌های اختصاصی بکار برده شده، گونه‌های پلاسمودیوم به طور قطعی از هم تمایز شدند.

در روش‌های دیگر امکان جداسازی نمونه‌های مخلوط وجود ندارد و اگر مقدار نمونه مورد بررسی برای انجام کارهای مکرر مولکولی کم باشد، مشکل دیگری نیز در امر ادامه کار به وجود خواهد آمد. در صورتی که با انجام PCR-RFLP این مسائل حل خواهد شد. با توجه به برش‌های آنزیمی، تفاوت جایگاه‌های برش در گونه‌ها و ایجاد قطعات متفاوت بر روی ژل الکتروفورز این گونه‌ها به راحتی از هم تمایز و قابل تفکیک هستند. استفاده از آنزیم‌های برش دهنده، صرفاً جهت تشخیص گونه‌ها است. اما اگر فقط مثبت یا منفی بودن نمونه، از نظر انگل مدنظر باشد، نیازی به استفاده کردن از آنزیم‌های برش دهنده نیست.

در این تحقیق، هیچ نوع واکنش متقاطعی با گونه‌ها دیده نشد، از طرف دیگر، به منظور حصول اطمینان از روند و

۶- منابع

- [1] Srinivasan S, Moody AH, Chiodini PL. Comparison of blood-film microscopy, the optimal dipstick, Rhodamine-123 fluorescence staining and PCR for monitoring anti-malaria treatment. Ann Trop Med Parasitol 2002; 94(3): 227-32.
- [2] Dominic E, Stiger S, Genton B. PCR amplification of DNA from malaria parasites on fixed and stained thick and thin blood films. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91: 361-3.
- [3] Harris E. A low-cost approach to PCR. Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. PP. 89-260, 1998.
- [4] Toma H, Kobayashi J, Vannachone B. A field study on malaria prevalence in southeastern Laos by polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 2001; 64: 257-61.
- [5] Tham JM, Lee SH, Tan TMC, Ting RCY. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: Comparison with microscopy and with parasite-F and ICT malaria Pf Tests in a clinical environment. J Clin Microbiol 1999; 37(5): 1269-73.
- [6] Ciceron L, Jaureguierry G, Gay F, Danis M. Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalaria treatment. J Clin Microbial 1999; 37(1): 35-8.
- [7] Kain KC. Detection of *Plasmodium vivax* by PCR in a field study. J Infect Dis 1993; 168: 1323-6.

- [8] Becker K, Ortmann C, Bajanowski T, Brinkmann B. Use of polymerase chain reaction for postmortem diagnosis of malaria. *Diag Mol Pathol* 1999; 8(4): 211-5.
- [۹] صاییجی، اسماعیل، بیماری‌های انگلی در ایران. جلد اول، موسسه انتشاراتی حیان، چاپ ششم، ۱۳۷۷، ص ۲۷۳-۳۶۰.
- [10] Kumar BK, Fadell M, sengal SC. Efficacy and limitations of QBC acridine orange staining as a routine diagnostic technique for malaria in development countries. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 96(4): 245-8.
- [11] Roper C, Elhassan IM. Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infection using the nested PCR and assessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54(4): 325-31.
- [12] Bouchaud O. Use of the parasight-F diagnostic test for imported in a travel clinic. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63: 76-9.
- [13] Fryauff DJ. Performance of the optimal assay for detection and identification of malaria infection in asymptomatic residents of Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63(3-4): 76-9.
- [14] Edrissian GhH, Afshar A. Detection of low malaria parasitemia using fluorescent antibody (IFA) and parasite concentration techniques. *Shiraz Med J* 1973; 4: 533-44.
- [16] Gonzalez-Ceron L, Rodriguez M. An enzyme-linkes Immunosorbent assay using detergent-soluble *Plasmodium vivax* antigen for sero-epidemiological surveys. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; 85: 358-61.
- [17] Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting human by nested PCR amplification. *Method Mol Biol*, 1996; 50: 263-9.
- [18] Zakeri S, Najafabadi S, Zare A, Djadid N. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: Evidence of highly mixed infection in Chabahar district. *Malaria J* 2002; 1(1): 2.
- [19] Abdullah NR. Development of a new diagnostic method for *Plasmodium falciparum* infection using a reverse transcriptase-PCR. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 54: 162-3.
- [20] Roubio JM, Benito A, Roche J, Berzona PJ. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(2): 183-7.

