

تشخیص گونه‌های پلاسمودیوم انسانی با روش PCR-RFLP

علی ابراهیمی^۱، عبدالحسین دلیمی اصل^{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 علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۱۰

دریافت مقاله: ۸۵/۱۱/۱۸

چکیده

هدف: مالاریا 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، سرولولژیکی 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 مالاریایی، که با گسترش‌های نازک و ضخیم مشخص شده، DNA انگل، استخراج و قطعه‌ای از ژن ۱۸S از RNA ریبوزومی با استفاده از آغازگرهای طراحی شده تکثیر گردید و با کمک از آنزیم‌های Hae III، Hinf I 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 فالسی‌پاروم تشخیص داده شد؛ در حالی که با روش مولکولی، ۲ مورد از ۱۱ مورد پلاسمودیوم فالسی‌پاروم، به‌عنوان پلاسمودیوم ویواکس و ۳ مورد از ۳۵ مورد پلاسمودیوم ویواکس به‌عنوان پلاسمودیوم فالسی‌پاروم، مشخص شد.

نتیجه‌گیری: روش PCR-RFLP در مقایسه با گسترش خونی، روشی بسیار مناسب‌تر و حساس‌تر برای تفکیک گونه‌های پلاسمودیوم است.

کلیدواژگان: تشخیص مالاریا، پلاسمودیوم ویواکس، پلاسمودیوم فالسی‌پاروم، PCR-RFLP.

۱- مقدمه

مالاریا 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

مطالعه مالاریا علاوه بر روش تهیه گسترش خونی، از آزمایش‌های سرولولژی نیز استفاده می‌شود. آزمایش‌های رسوبی، ملانوفلوکولاسیون (Melano-flocculation)، همآگلوتیناسیون (Haemagglutination) غیر مستقیم، روش‌های ثبوت مکمل، ایمنوفلورسانس (Indirect fluorescent Antibody) IFA (Immunofluorescent) و الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) از

جمله این شیوه‌ها است.

۲- مواد و روش کار

۱- از افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های شهرستانهای چابهار و زاهدان نمونه خون گرفته شد و در مجموع، ۴۶ نمونه خون مثبت مالاریایی با روش گسترش ضخیم تشخیص داده شد. ۲- گونه انگل با روش گسترش نازک خونی، رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسا (Geimsa) و بررسی با میکروسکوپ نوری در آزمایشگاه صورت گرفت.

۳- استخراج DNA پلاسمودیوم‌ها: DNA انگل با کیت DNA-PLUS (Cinnagen) 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 ۱۸S rRNA تکثیر گردید. توالی این ژن از بانک ژن به دست آمد و به وسیله شرکت ژل ست الیگز سنتز و به صورت لیوفلیزه ارسال شد. ترکیب آغازگرها به صورت زیر می‌باشد:

۳'-AAC CTG GTT GAA CTT GCC AGT AGT-۵' : رفت ۱

۳'-CCA AGC TAC TCC TAT TAA TCG TAA-۵' : برگشت ۱

۳'-TAT ATG TAG AAA CTG CGA ACG GTC-۵' : رفت ۲

۳'-CAA CTA CGA GCG TTT TAA CTG CAA-۵' : برگشت ۲

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 ۳۰ واسرشتگی (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.

برخی از محققین از روش PCR برای جنبه‌های مختلف از جمله تشخیص مالاریا استفاده نموده‌اند. به طور کلی کاربرد PCR در تشخیص اولیه بیماری مالاریا، افتراق گونه‌های انگل مالاریا، (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 مالاریا، 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 ژنوتایپ (genotype) انگل، بررسی تنوع انگل و بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بسیار مفید است [۲-۶]. علاوه بر این تشخیص مقادیر کم انگل‌های مالاریا 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 مالاریا در جمعیت کل، بررسی انتشار جغرافیایی آن‌ها، تأیید پاک شدن انگل پس از درمان، تشخیص و افتراق عفونت‌های مجدد ناشی از نارسایی درمان، غربال‌گری اهداکنندگان خون، تعیین و شناسایی حاملان بدون علامت در مناطق بومی در بررسی‌های اپیدمیولوژیک، تشخیص مالاریای 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 [۵، ۸، ۷].

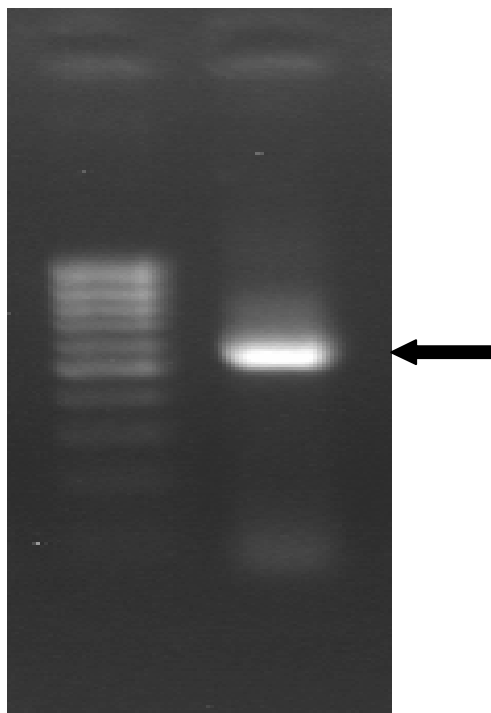
اهداف این پژوهش عبارت بوده است از:

۱- تشخیص گونه‌های مختلف پلاسمودیوم از بیماران آلوده و مبتلا به مالاریا 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.

۳-۱- نتایج برش آنزیمی

آنزیم Hinf I، پلاسمودیوم فالسی پاروم 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 فالسی پاروم 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 فالسی پاروم 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 و Hae III استفاده شد. آنزیم Hinf I پلاسمودیوم فالسی پاروم (*Plasmodium falciparum*) و پلاسمودیوم مالاریه (*Plasmodium malariae*) را از پلاسمودیوم ویواکس (*Plasmodium vivax*) و پلاسمودیوم اوواله (*Plasmodium ovale*) جدا می‌کند. برای جداسازی پلاسمودیوم فالسی پاروم از پلاسمودیوم مالاریه از آنزیم Hae III و برای تفکیک پلاسمودیوم ویواکس از پلاسمودیوم اوواله از آنزیم Tsp45I استفاده شد.

۳- نتایج

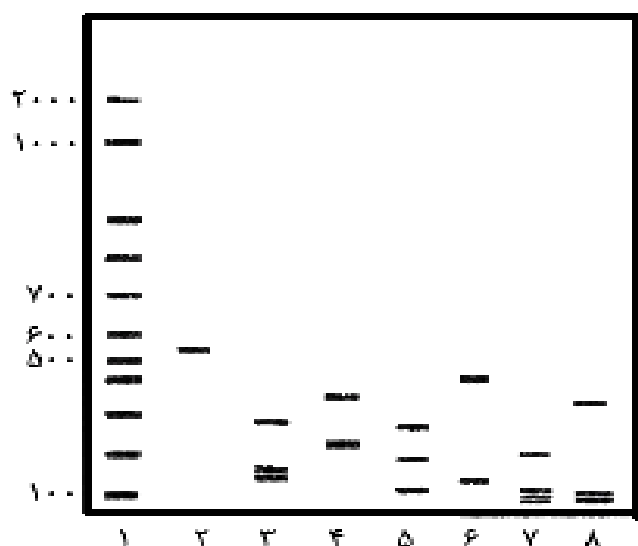
جدول شماره ۱ نتایج بررسی نمونه‌ها با دو روش گسترش خونی و مولکولی را نشان می‌دهد. بین بررسی مولکولی و روش گسترش خونی تفاوت‌هایی در تشخیص گونه پلاسمودیوم مشاهده شد. این تفاوت‌ها بدین صورت بود که از ۳۵ مورد تشخیص داده شده با گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده با گیمسا، که پلاسمودیوم ویواکس بودند، ۳ مورد از آنها پلاسمودیوم فالسی پاروم و از ۱۱ مورد پلاسمودیوم فالسی پاروم، ۲ نمونه پلاسمودیوم ویواکس بودند. بدین ترتیب ۳۴ مورد از نمونه‌ها، پلاسمودیوم ویواکس و ۱۲ مورد پلاسمودیوم فالسی پاروم 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

نوع آلودگی	روش گسترش خونی		روش مولکولی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
پلاسمودیوم ویواکس	۳۵	۷۶/۰۹	۳۴	۷۳/۹
پلاسمودیوم فالسی پاروم	۱۱	۲۳/۹۱	۱۲	۲۶/۱

ویواکس را به سه قطعه ۱۴۷، ۲۰۸ و ۲۶۲ جفت بازی ولی پلاسمودیوم اوواله را به دو قطعه تقسیم می‌کند (شکل ۳، ۲).

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، ۲).

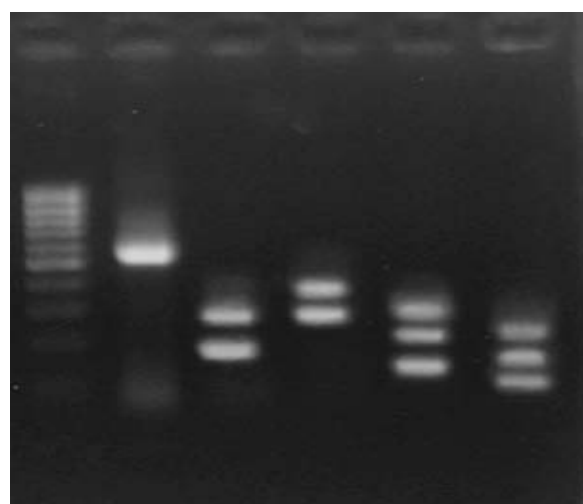


شکل ۳ تصویر شماتیک الگو نمونه گونه‌های پلاسمودیوم انسانی در تکنیک PCR-RFLP

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 فالسی پاروم و پلاسمودیوم مالاریه بعد از آنزیم Hinf I؛ ستون پنج: الگو پلاسمودیوم ویواکس بعد از آنزیم Tsp45I؛ ستون شش: الگو پلاسمودیوم اوواله بعد از آنزیم Tsp45I؛ ستون هفت: الگو پلاسمودیوم فالسی پاروم بعد از آنزیم HaeIII؛ ستون هشت: 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 مقرون 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 افتراق گونه‌های چهارگانه پلاسمودیوم و تعیین بار انگلی بکار می‌روند. تنها مسأله‌ای 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 چپ:

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 فالسی پاروم یا پلاسمودیوم مالاریه پس از اثر آنزیم Hinf I؛ ستون پنج: پلاسمودیوم ویواکس پس از اثر آنزیم Tsp45 I؛ ستون شش: پلاسمودیوم فالسی پاروم پس از اثر آنزیم Hae III

برای تفکیک پلاسمودیوم فالسی پاروم از پلاسمودیوم مالاریه، از آنزیم Hae III استفاده شد. آنزیم Hae III توالی ژنی پلاسمودیوم فالسی پاروم را در جایگاه‌های ۲۱۶، ۳۴۱ و ۴۹۲ جفت بازی برش می‌دهد. این امر منجر به تشکیل چهار قطعه ژن روی ژل آگارز 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 ژن 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 I استفاده شد. این آنزیم، پلاسمودیوم

سال‌های اخیر در تشخیص انگل‌های مالاریا بکار برده شده‌اند، همگی برحسب کاربری حساسیت و ویژگی متفاوت دارند.

روش (Quantitative Buffy Coat) QBC، یکی از روش‌های نسبتاً جدید، سریع، تقریباً حساس و اختصاصی برای تشخیص انگل‌های مالاریا است. در این شیوه نمونه خون آلوده در لوله‌های موئینه حاوی هپارین (Heparin) و رنگ آکردین نارنجی ریخته می‌شود و بعد از سانتریفوژ، انگل‌های رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ ایمونوفلورسانس، قابل تشخیص هستند. این روش برای تعیین گونه‌های مالاریا، 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 محدودیت‌های این روش، نبود میکروسکوپ ایمونوفلورسانس در برخی از آزمایشگاه‌ها است [۲].

استفاده از نوارهای تشخیص آنتی‌ژن‌های پلاسمودیوم فالسی پاروم، از یافته‌های دیگر و جدید در عرصه تشخیص مالاریا می‌باشد. از این گروه می‌توان به آزمایش‌های انگلی F (Falciparum) و (Immunochromatographic test) ICT اشاره نمود. در این دو آزمایش پادتن‌های پوشش شده متصل روی فاز جامد یا همان نوار در صورت مواجه شدن با آنتی‌ژن پروتئین II غنی از هیستیدین (Histidin)، که در گلبول‌های آلوده پلاسمودیوم فالسی پاروم یافت می‌شود، با ایجاد یک واکنش رنگی، قابل تشخیص خواهد بود [۱۲، ۱۳].

به‌طور 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 [۱۲، ۱۳]. از جمله آزمون‌های دیگر تشخیص مالاریا روش‌های

سرولولژیکی است. در مطالعه‌ای که به وسیله ادریسیان و همکاران در سال ۱۹۷۹ میلادی در جنوب ایران انجام شد، مقایسه‌ای بین دو روش IFA و الایزا از نظر جستجوی پادتن مالاریایی 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 مالاریا وجود دارد، با توجه به سهولت کار و اقتصادی بودن از نظر هزینه می‌تواند مفید باشد. در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی مالاریا به منظور معین شدن فراوانی موارد مثبت بیماری در ساکنان یک منطقه، آزمایش‌های سرولولژیک می‌توانند در ارزشیابی برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی مالاریا، کمک به تأیید تشخیص موارد حاد بیماری، تعیین نوع انگل ایجاد کننده بیماری و ردیابی اهداکنندگان خون (به‌عنوان ناقلان بیماری) مفید باشند [۱۵].

استفاده از فناوری تکثیر اسیدهای نوکلئیک از دستاوردهای جدید در زمینه تشخیص انگل‌های مالاریا است. آنچه که این روش را از سایر روش‌ها متمایز می‌نماید و بیشتر پژوهشگران در استفاده از آن اتفاق نظر دارند، حساسیت و ویژگی فوق‌العاده زیاد و قابلیت بالای افتراق گونه‌ها نسبت به شیوه گسترش ضخیم است. تاکنون پژوهشگران متعددی از این روش استفاده نموده‌اند که به‌عنوان مثال می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تکثیر ژن ۱۸S با Nested-PCR به وسیله اسنوو و همکاران [۱۶]. استفاده از روش (Nested-PCR) به وسیله ذاکری و همکاران در کشور ایران برای تفکیک گونه‌های پلاسمودیوم از یکدیگر [۱۷]. تکثیر ژن rRNA ۱۸S با انجام RT-PCR به وسیله عبدا... و همکاران [۱۸]. تکثیر ژن CSP (Circum Sporozoite) جهت تشخیص و افتراق گونه‌ها [۷] و انجام تکنیک PCR چندگانه (Multiplex PCR) به عنوان یک شیوه قابل اعتماد در تشخیص و افتراق گونه‌ها [۱۹]. PCR-RFLP یکی از حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش‌های علمی موجود می‌باشد که در این پژوهش از آن استفاده شد.

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 متمایز 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 متمایز 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 مد نظر باشد، نیازی به استفاده کردن از آنزیم‌های برش دهنده نیست.

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

درستی کار، DNA افراد ساکن در مناطق پاک و غیر آلوده به مالاریا بررسی شد و هیچ گونه واکنش متقاطع 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 آلوده به مالاریا، مشاهده شد که پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسی‌پاروم بودند و پلاسمودیوم مالاریه در این نمونه‌ها دیده نشد. سه مورد از پلاسمودیوم ویواکس و دو مورد پلاسمودیوم فالسی‌پاروم که در تشخیص میکروسکوپی اشتباه تشخیص داده شده بودند با روش مولکولی تأیید شدند.

در این میان از طریق تشخیص لام‌های نازک رنگ‌آمیزی شده با گیمسا ۷۷۰۹ درصد آلودگی مربوط به پلاسمودیوم ویواکس و ۲۳/۹۱ درصد آلودگی مربوط به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم بودند. بعد از انجام PCR-RFLP ۷۳/۹ درصد آلودگی مربوط به پلاسمودیوم ویواکس و ۲۶/۱ درصد آلودگی مربوط به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم شناسایی شدند.

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, Jaureguiberry G, Gay F, Danis M. Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalaria treatment. *J Clin Microbiol* 1999; 37(1): 35-8.
- [7] Kain KC. Detection of *Plasmodium vivax* by PCR in a field study. *J Infec 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] صایبی، 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 [15] parasitemia using fluorescent antibody (IFA) and parasite concentration techniques. *Shiraz Med J* 1973; 4: 533-44.
- [16] Gonzalez-Ceron L, Rodriguez M. An enzyme-linked 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.

