Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 17:26 +0330 on Monday January 22nd 2018

ردیابی پلاسمودیوم ویواکس با روش Nested-PCR در افراد دارای سابقه ابتلاء به مالاریای ویواکس در مناطق مالاریاخیز شمال غرب کشور

دکتر عباس شهبازی [۱] دکتر احمد رئیسی [۲] دکتر مهدی آسمار [۳] دکتر سعید نداف [۳] دکتر مهدی ناطق‌پور [۴] دکتر غلامرضا انارکی [۵] محمود مهامی [۶]

[۱] مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز [۲] مرکز مدیریت بیماریها، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، [۳] گروه انگل‌شناسی انستیتوپاستور ایران، [۴] دانشیار گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران [۵] پاتولوژیست، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان [۶] دانشجوی دکترای انگل‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس

مجله پزشکی هرمزگان سال سیزدهم شماره اول بهار ۸۸ صفحات ۱۲-۷

چکیده

مقدمه: *مالاریا از مهمترین بیماری‌های انگلی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان به شمار می‌آید و سالیانه تعداد کثیری از مردم جهان به این بیماری مبتلا شده و یا در اثر ابتلاء به آن می‌میرند. تشخیص انگل در افراد بیمار مبتنی بر شواهد بالینی و بهره‌گیری از روش‌های آزمایشگاهی از جمله روش‌های میکروسکوپی و مولکولی است. این مطالعه به منظور ردیابی عامل بیماری در بیماران درمان شده و بدون نشانه برای تشخیص عفونت‌های latent/sub-patent صورت گرفته است.*

روش کار: *در این مطالعه توصیفی، نمونهٔ خون وریدی ۳۸ نفر از ساکنان شهرستان‌های پارس‌آباد دراستان اردبیل و کلیبر در استان آذربایجان شرقی پس از حدود یکسال از ابتلای اولیه به مالاریای ویواکس و درمان اساسی بر اساس پروتکل استاندارد کشوری تهیه و پس از آزمایش اولیهٔ میکروسکوپی گسترش‌های ضخیم و نازک خون محیطی و تشخیص منفی بودن آنها، به انستیتو پاستور ایران انتقال و با تکنیک Nested -PCR مورد بررسی قرار گرفتند.*

نتایج: *بررسی گسترش‌های خونی بیماران مذکور توسط میکروسکوپیست ماهر نشان می‌دهد که همگی منفی بودند ولی آزمایش Nested -PCR یکی از نمونه‌ها از لحاظ انگل پلاسمودیوم ویواکس مثبت تشخیص داده شد.*

نتیجه‌گیری: *اگرچه از آزمایش میکروسکوپی در تشخیص مالاریا به عنوان یک روش انتخابی یاد می‌شود ولی با توجه به احتمال وجود عفونتهای latent/sub-patent در مناطق آندمیک و بروز خطای تشخیص میکروسکوپی گسترش‌های ضخیم و نازک خون محیطی و اهمیت اپیدمیولوژیک این موضوع در موفقیت برنامه‌های کنترل مالاریا، استفاده از روش‌های مولکولی به خصوص روش مولکولی Nested -PCR در بیماران دارای سابقهٔ ابتلاء به مالاریا و حاملین سالم مفید بنظر می‌رسد.*

کلیدواژه‌ها: *مالاریا – پلاسمودیوم ویواکس –PCR – ایران*

نویسنده مسئول:
دکتر عباس شهبازی
گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تبریز
تبریز – ایران
تلفن: ۳۳۷۳۷۴۵ ۴۱۱ ۹۸+
پست الکترونیکی:
Shahbazy42@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۱۲ اصلاح نهایی: ۸۷/۶/۱۳ پذیرش مقاله: ۸۷/۸/۷

مقدمه:

مالاریا یکی از مهمترین بیماریهای عفونی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است که سالانه سیصد تا چهارصد میلیون نفر در سراسر جهان به آن مبتلا می‌شوند. ابتلا به این بیماری توسط چهار گونه از جنس پلاسمودیوم موسوم به پلاسمودیوم ویواکس، پلاسمودیوم فالسیپاروم، پلاسمودیوم مالاریه و پلاسمودیوم اووال صورت می‌گیرد که هر یک در مناطق خاصی از جهان انتشار دارند (۱). ابتلاء به مالاریا توسط گونه‌های پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم از مشکلات بهداشتی مناطق جنوب،

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 17:26 +0330 on Monday January 22nd 2018

جنوب شرقی و نیز شمال غرب کشور ایران می‌باشد که در این بین مالاریای ویواکس با حدود ۹۰٪ موارد مالاریا (۲) هم از لحاظ فراوانی و هم از لحاظ الگوهای بیولوژیک از قبیل ایجاد عفونت latent/sub-patent و عود (relaps) از اهمیت بسزایی برخوردار است. بر اساس تحقیق انجام شده در ایران میزان عود پلاسمودیوم ویواکس در یک و دو سال بعد از حملهٔ اولیه به ترتیب ۱۶/۸٪ و ۲۴/۵٪ بوده است که این ریسک مطابق با الگوی مناطق معتدل است (۳).

به طور معمول جهت تشخیص بیماری مالاریا و نیز تعیین گونهٔ عامل بیماریزا، از بررسی میکروسکوپی گسترش‌های ضخیم و نازک خون محیطی تهیه شده از بیمار پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا استفاده می‌شود. تشخیص بیماری معمولاً با مطالعهٔ ۱۰۰ میدان از گسترش ضخیم و تشخیص گونهٔ عامل بیماریزا غالباً با استفاده از گسترش‌های نازک میسر می‌گردد (٤). با توجه به وجود عفونتهای latent/sub-patent در مناطق آندمیک و اهمیت اپیدمیولوژیک این موضوع در طراحی برنامهٔ کنترل مالاریا، استفاده از روش‌های مولکولی که دقت بالایی را در یافتن میزان کم انگل در بیماران دارند ضروری است. این روشها توانایی تشخیص تعداد یک انگل در میکرولیتر خون، یا پارازیتمی معادل ۰/۰۰۰۰۲ درصد، یا یک انگل در ٤۰۰ میدان میکروسکوپ را دارند که پنج برابر قدرت تشخیص میکروسکوپی گسترشهای ضخیم با رنگ‌آمیزی گیمسا است (٤). مناسب‌ترین جایگزین برای روش میکروسکوپی استفاده از روش‌های وابسته به DNA است. جدیدترین پیشرفت در زمینهٔ تکنولوژی نوترکیبی DNA، روش RCR می‌باشد که با استفاده از آن امکان سنتز خارج سلولی (In vitro) میلیون‌ها نسخه از توالی DNA هدف وجود دارد (٥). روش PCR دارای حساسیت بسیار بالا و کاملاً اختصاصی است و نه تنها گونهٔ انگل بلکه تنوع ژنتیکی بین و یا داخل جمعیت‌ها را نیز می‌تواند مشخص نماید (٦). در این روش از تشخیص مولکولی مالاریا مناطق خاصی از ژن‌های ریبوزومال (rDNA) به نام ssrDNA در گونه‌های مختلف انگل مالاریا که دارای توالی‌های مختص به گونه می‌باشند با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و شناسایی می‌شوند (۷). Snounou و همکاران (۱۹۹۳) با استفاده از روش Nested-PCR توانستند چهار گونهٔ انسانی انگل مالاریا را در سطح گونه شناسایی کنند (۸).

این مطالعه به منظور ردیابی انگل پلاسمودیوم ویواکس در بیماران درمان شده بدون نشانه برای تشخیص عفونتهای latent/sub-patent مالاریا صورت گرفته است. در این مطالعه علاوه بر روش میکروسکوپی از تکنیک مولکولی Nested-PCR نیز برای تشخیص و تعیین گونه، استفاده شده است.

روش کار:

این تحقیق در شهرستان‌های پارس‌آباد از استان اردبیل و کلیبر از استان آذربایجان شرقی انجام شد. شهرستانهای فوق در شمال غرب ایران واقع شده‌اند و از کانون‌های انتشار مالاریا در ایران می‌باشند. اکثریت قریب به اتفاق موارد ابتلاء به مالاریا در این منطقه ناشی از *پلاسمودیوم ویواکس* بوده‌اند (۹). جامعهٔ مورد تحقیق شامل ۳۸ نفر از افرادی می‌شد که طی یک و نیم سال قبل از انجام بررسی با تشخیص مالاریای ویواکس تحت درمان اساسی قرار گرفته بودند و حداقل نه ماه از درمان آنها گذشته بود وهیچ گونه علائم و نشانه‌های بالینی مرتبط با مالاریا را از خود بروز نداده بودند. این مطالعه بر روی نمونه‌های خون وریدی صورت گرفت و برای تشخیص بیماری و تعیین گونهٔ عامل بیماریزا از گسترش ضخیم و نازک خون محیطی و نیز تکنیک Nested -PCR استفاده شد.

از هر کدام از بیماران فوق پس از اخذ رضایت کتبی به مقدار ۱ میلی‌لیتر خون وریدی تهیه شد. چهار قطره از هر نمونه جهت تهیهٔ گسترش ضخیم و نازک مورد استفاده قرار گرفت که پس از تهیه، با روش گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و مابقی نمونه‌ها پس از مخلوط شدن با EDTA جهت انجام آزمایشات مولکولی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و به انستیتو پاستور تهران انتقال یافتند. لام‌های

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 17:26 +0330 on Monday January 22nd 2018

رنگ‌آمیزی شده توسط یک میکروسکوپیست ماهر بصورت کور مورد بررسی قرار گرفتند.

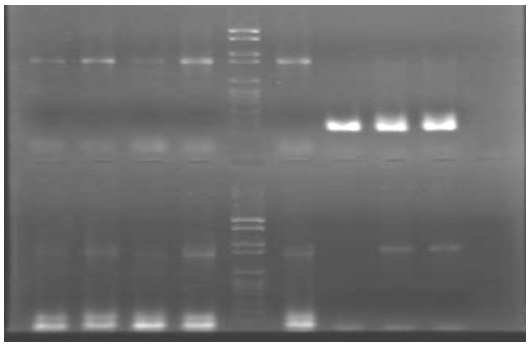
در این مطالعه استخراج DNA انگل *پلاسمودیوم ویواکس* به روش Leclerc صورت گرفت (۱۰). بطور خلاصه در این روش بر روی ۲۰۰ میکرولیتر از خون به میزان دو برابر PBS سرد اضافه کرده آن را در ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ کردیم. سپس مایع رویی را دور ریخته و این کار را سه بار تکرار نمودیم. در مرحلهٔ بعد با افزودن RNase نمونه را بمدت دو ساعت در اینکوباتور قرار داده سپس به نمونه پروتئیناز K اضافه آنرا به مدت ۲ ساعت در اینکوباتور قرار داده سپس سانتریفیوژ نموده محلول رویی دور ریخته شد. در مرحلهٔ بعد به میزان هم حجم به نمونه فنل کلروفورم ریخته پس از سانتریفیوژ به محلول رویی کلروفورم اضافه و مجدداً سانتریفیوژ نموده فاز رویی را برداشته با اتانول سرد در دو مرحله رسوب داده در نهایت DNA استخراج شد. در این مطالعه مناطق خاصی از ژن‌های ریبوزومال (rDNA) به نام ssrDNA در گونه‌های مختلف انگل مالاریا که دارای توالی‌های مختص به گونه می‌باشند با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شدند (۷).

در مرحلهٔ اول PCR پرایمرهای rPLU5 و rPLU6 و در مرحلهٔ دوم پرایمرهای rFLA1 و rFLA2 برای تشخیص گونهٔ پلاسمودیوم فالسیپاروم و پرایمرهای rVIV1 و rVIV2 برای تشخیص گونهٔ پلاسمودیوم ویواکس استفاده گردیدند (جدول شماره ۱) (۸).

شرایط ترموسایکلر برای تکثیر قطعه موردنظر در هر دو مرحلهٔ اول و دوم عبارت بود از: ۹٤ °c بمدت ۳ دقیقه در یک سیکل، ۹٤ °c بمدت ٦۰ ثانیه، ٥٦ °c بمدت ۲ دقیقه و ٦۸ °c بمدت ۲/٥ دقیقه در ۳۰ سیکل و در نهایت به مدت ۷ دقیقه در حرارت ۷۲° C. در این مطالعه از ترموسایکلر با مارک Ependorf و مدل Master cycler gradiant استفاده شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۲٪ برای تشخیص گونه با آغشته نمودن به اتیدیوم بروماید در بافر TBE الکتروفورز گردیده و سپس به کمک دستگاه UV Trans-illuminator مورد بررسی و مشاهده قرار گرفتند (۷،۸). در این بررسی از نمونه‌های افراد مبتلا به پلاسمودیوم فالسیپارم و افراد غیرمبتلا به عنوان کنترل منفی و از نمونه‌های افراد مبتلا به پلاسمودیوم ویواکس که حداقل دارای تعداد ٤۰۰ انگل در میکرولیترخون بودند، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

نتایج:

در این مطالعه، گسترش‌های خونی مربوط به تشخیص اولیهٔ هر ۳۸ مورد از طریق آزمایش میکروسکوپی کنترل و تشخیص اولیه آنها تأیید گردید. گسترش‌های خونی مربوط به پیگیری پس از درمان بیماران مذکور نیز دوباره بررسی شد که همگی منفی بودند. همچنین در هیچ کدام از گسترش‌های خونی تهیه شده در زمان اجرای بررسی (یعنی پس از گذشت حداقل ۹ ماه از تشخیص و درمان اولیه) نیز انگل مشاهده نشد. به دنبال انجام Nested-PCR با پرایمرهای مربوطه، تنها در یک نمونه باند bp ۱۲۰ مربوط به پلاسمودیوم ویواکس مشاهده شد (تصویر شماره ۱) و بقیهٔ ۳۷ نمونهٔ مورد مطالعه از لحاظ پلاسمودیوم ویواکس منفی گردیدند. همچنین تمامی ۳۸ نمونهٔ بررسی شده با پرایمر پلاسمودیوم فالسیپاروم (rFLA1 و rFLA2) نیز منفی شدند. همانگونه که در تصویر شماره ۱ مشاهده می‌گردد، تمام نمونه‌های شاهد پلاسمودیوم فالسیپاروم با پرایمر مربوطه مثبت شده و باند حدود bp ۲۰۵ را تشکیل داده‌اند و تمام نمونه‌های شاهد پلاسمودیوم ویواکس با پرایمر مربوطه مثبت شده و باند حدود bp ۱۲۰ را تشکیل داده‌اند.



تصویر شماره ۱

در این تصویر، ستونهای ۱، ۲، ۳، ٤ و ٦ بالا حاوی تعدادی از نمونه‌های بررسی شده با پرایمر پلاسمودیوم

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 17:26 +0330 on Monday January 22nd 2018

ویواکس که منفی شده‌اند، می‌باشند. ستونهای ۷، ۸ و ۹ بالا حاوی نمونه‌های شاهد پلاسمودیوم فالسیپاروم با پرایمر پلاسمودیوم فالسیپاروم، ستونهای ۱، ۲، ۳، و ٤ پائین حاوی نمونه‌های شاهد پلاسمودیوم ویواکس Nested PCR شده با پرایمر پلاسمودیوم ویواکس، نمونه ٦ پائین یک مورد مثبت کشف شده از بین ۳۸ مورد بررسی شده و ستونهای ۷، ۸ و ۹ پائین از چپ حاوی نمونه‌های شاهد منفی است. ستونهای بالا و پائین حاوی مارکر ٦ (Rosche) هستند.

جدول شماره ۱- پرایمرهای استفاده شده برای تشخیص پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم با غلظت استفاده شده و طول محصول PCR ایجاد شده

	نام	توالی	غلظت پرایمرها	طول محصول
جنس	rPLU5	5-CTT GTT GTT GCCTTA AAC TTC-3	۱/۲۸ µm	۱۲۰۰bp
پلاسمودیوم	rPLU6	5- TAA AAA TTG TTG CAG TTA CG-3	۱/۰٤ µm	
گونه	rFAL1	5- TTA ACC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3	۰/۷٦ µm	۲۰۵bp
فالسیپاروم	rFAL2	5- ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3	۰/۸ µm	
گونه	rV1V1	5- CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAA TGA TAC-3	۰/۷۲ µm	۱۲۰bp
ویواکس	rV1V2	5- ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3	۰/۵۲ µm	

بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه در شهرستان‌های پارس‌آباد از استان اردبیل و کلیبر از استان آذربایجان شرقی بر روی ۳۸ بیمار که در طول یک ونیم سال قبل از انجام بررسی مبتلا به مالاریای ویواکس شده بودند، به منظور ردیابی پلاسمودیوم ویواکس در بیماران بهبود یافته و یا به عبارت دیگر برای تشخیص حاملین سالم و بدون علائم بالینی مالاریا صورت گرفته است. امروزه در مطالعات متعدد اهمیت حاملین بدون علائم مالاریا بعنوان مخازن مهم انگل و عامل حفظ سطوح بالای انتقال بیماری نشان داده شده است. بعنوان مثال در مطالعات انجام شده در برزیل طی سالهای ۲۰۰۱ تا ۲۰۰٤ حاملین بدون علائم عامل اصلی وقوع اپیدمی‌های کانونی در برخی مناطق شهری تشخیص داده شده‌اند (۱۱). روش استاندارد تشخیص مالاریا استفاده از گسترش خون محیطی است که روشی آسان و قابل استفاده در فیلد می‌باشد و به همین دلیل در آزمایشگاه‌های محیطی مالاریا روش انتخابی جهت تشخیص بیماری است. اما نیاز به مهارت آزمایش‌کننده و در واقع وابسته به فرد بودن این تکنیک از معایب آن می‌باشد که حتی در صورت وجود میکروسکوپیست متبحر و نیز صحت انجام مراحل آزمایش، حداکثر حساسیت آن شناسایی تعداد ٤ انگل در میکرولیتر می‌باشد (٤). این روش در برنامه‌های حذف مالاریا در شناسایی حاملین بدون علامت و دارای تعداد کم انگل در خون محیطی و نیز موارد توأم (mix) از حساسیت کافی برخوردار نیست.

مطالعهٔ دیگری در آمازون برزیل نشان داد که بیشتر موارد حاملین بدون علائم مالاریا بدلیل تعداد بسیار اندک انگل در خون تنها بوسیلهٔ PCR قابل شناسایی هستند. همچنین این مطالعه اثبات نمود که همین تعداد اندک انگل در حاملین بدون علاعم قادر به انتقال عفونت به پشه‌های آنوفل و در نتیجه حفظ بیماری در منطقه می‌باشند (۱۲). امروزه با استفاده از روش‌های مولکولی از جمله تکنیک‌های مبتنی بر PCR بطور قابل توجهی بر حساسیت و ویژگی روش‌های تشخیصی افزوده شده است (٥،٦). در این مطالعه برای شناسایی و تعیین گونهٔ انگل مالاریا از گسترش‌های ضخیم و نازک خونی و روش Nested -PCR استفاده گردید. حساسیت روش Nested -PCR در تشخیص جنس و گونهٔ انگل در منابع علمی تا حدی متفاوت بیان شده است و تا تعداد ۲ انگل در میکرولیتر می‌رسد. در صورتی که شمارش طبیعی گلبول‌های قرمز در هر میکرولیتر پنج میلیون در نظر

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 17:26 +0330 on Monday January 22nd 2018

گرفته شود این روش قدرت تشخیص ٤ انگل در ده میلیون گلبول قرمز را داراست (٠/٠٠٠٠٤ درصد) که حساسیت تشخیصی آن تقریباً دو تا سه برابر روش تشخیص میکروسکوپی گسترش‌های خونی است (٧،٨). ذکر این نکته ضروری است که برآورد حساسیت روش PCR در مطالعات مختلف تا حدی متفاوت بوده است کمااینکه در رفرانس شمارهٔ ٤ حساسیت این روش پنج برابر و در رفرانسهای ٧ و ٨ دو تا سه برابر روش میکروسکوپی ذکر شده است. البته باید این نکته را بخاطر داشت این روشها با توجه به تغییراتی که در آنها صورت می‌گیرد و همچنین بالا رفتن کیفیت معرف‌ها و محلول‌های مصرفی استعداد قابل توجهی در بهبود میزان حساسیت و ویژگی خواهند داشت (٧). در این مطالعه، گسترش‌های خونی بیماران مذکور توسط یک میکروسکوپیست ماهر بررسی شد که همگی منفی بودند ولی آزمایش Nested -PCR یکی از نمونه‌ها مثبت بوده و گونهٔ انگل نیز پلاسمودیوم ویواکس تشخیص داده شد که با دو مرتبه تکرار آزمایش نتیجهٔ آزمایش اولیه تأیید گردید. البته بدیهی است که مورد مثبت بدست آمده دارای تعداد کمی انگل در خون محیطی خود بوده است که می‌توانست از دید یک میکروسکوپیست متبحر نیز مخفی بماند. از آنجا که از نه ماه قبل از انجام بررسی تاکنون هیچ مورد مثبتی از بیماری مالاریا در این مناطق گزارش نشده است و مورد مذکور نیز که یک زن میانسال بوده و هیچگونه مسافرتی نداشته است، احتمال ایجاد عفونت مجدد در بیمار مذکور را می‌توان در حد صفر فرض نمود. لذا، با حذف فرض عفونت مجدد می‌توان این مورد مثبت را مربوط به پدیده عود انگل ناشی از هیپنوزوئیت‌های کبدی و یا مقاومت دارویی دانست که تعیین دقیق آن نیاز به بررسی‌های وسیع‌تر دارد. ولی علت آن هرچه باشد، این وضعیت سبب باقی ماندن انگل به شکل نهفته و به عنوان یک منبع در منطقه تحت کنترل شده و در نهایت می‌تواند باعث شکست برنامه‌های حذف مالاریا گردد. بنابراین، اگر چه از آزمایش میکروسکوپی در تشخیص مالاریا به عنوان یک روش انتخابی Golden standard یاد می‌شود (١٣) ولی با توجه به احتمال وجود عفونتهای latent/sub-patent در مناطق آندمیک و بروز خطای تشخیص میکروسکوپی گسترش‌های ضخیم و نازک خون محیطی و اهمیت اپیدمیولوژیک این موضوع در طراحی برنامه‌های کنترل و حذف مالاریا و بویژه در مناطقی که حفظ دستاوردهای کنترل مالاریا مدنظر است، استفاده از روش‌های مولکولی به خصوص روش مولکولی Nested -PCR با دقت بالا در یافتن میزان کم انگل جهت کشف حاملین سالم و یا موارد عود ضروری به نظر می‌رسد.

محدودیت عمدهٔ این مطالعه کم بودن تعداد نمونه بوده است که با توجه به اینکه کل موارد دارای سابقهٔ ابتلا همین تعداد بوده‌اند اجتناب‌ناپذیر بود.

سپاسگزاری:

این تحقیق با مساعدت ادارهٔ کنترل مالاریای مرکز مدیریت بیماریها و مراکز بهداشت استان‌های اردبیل و آذربایجان شرقی به انجام رسیده است که از آنان قدردانی می‌شود.

منابع References

1. Roll Back Malaria, World Health Organization, United Nations Children's Fund (UNICEF). World malaria report. *World Health Organization*. 2005; Report No: WHO/HTM/MAL/2005.1102.
2. Zakeri S, Mamaghani S, Mehrizi A, Shahsavari Z, Raeisi A, Arshi S, *et al*. Molecular evidence of mixed Plasmodium vivax and P. falciparum infections in northern Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 2004;10(3):336–342.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 17:26 +0330 on Monday January 22nd 2018

3. Haghdoost AA, Mazhari S, Bahaadini K. Estimating the relapse risk of Plasmodium vivax in Iran under national chemotherapy scheme using a novel method. *J Vector Borne Dis*. 2006;43(4):168-172.
4. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin Lab Hae.*1999;21:235–245.
5. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymat amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239:487-491.
6. Arez AP, Lopes D, Pinto J, Franko AS, Snounou G, do Rosario VE, et al. Plasmodium sp. Optimal protocols for PCR detection of low parasite members from mosquito (Anopheles sp.) samples. *Experiment Parasitol*. 2000;94:269-272.
7. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Br Own KN, et al. Identification of the human parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Bioch Parasitol*. 1993;58:283-292.
8. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosari VE, et al. High sensivity of detection of human malaria parasites by use of Nested PCR amplification. *Mol Bioch Parasitol*. 1993;61:315-320.
9. Disease Management Center. Annual report of Malaria control department. Tehran: 2006.
10. Leclerc MC, Gauthier C, Villegas L, Urdaneta L. Genetic diversity of merozoite surface protein-1 gene of plasmodium vivax isolates in mining villages of Venezuela (Bolivar State). *Acta Trop*. 2005;95(1):26-32.
11. Tada MS, Marques RP, Mesquita E, Dalla Martha RC, Rodrigues JA, Costa JD, et al. Urban malaria in the Brazilian Western Amazon Region I: high prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(3):263-269.
12. Alves FP, Gil lh, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH. Asymptomatic carriers of Plasmodium spp. As infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol*. 2005;42(5):777-779.
13. Contamin H, Fandeur T, Rogier C. Different genetic characteristics of Plasmodium falciparum isolates collected during successive clinical malaria episodes in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;54(6):633-643.